



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Evaluación de factores de virulencia de cepas de
Salmonella spp. aisladas de cuyes (*Cavia porcellus*)
enfermos y sanos**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Carla Gabriela DURAN GONZALES

ASESOR

Abelardo Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Duran, C. (2019). *Evaluación de factores de virulencia de cepas de Salmonella spp. aisladas de cuyes (Cavia porcellus) enfermos y sanos*. Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario. Escuela Profesional de Medicina Veterinaria, Facultad de Educación, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

CÓDIGO ORCID DEL AUTOR: 0000-0002-7679-0817

DNI (AUTOR): 71985103

CÓDIGO ORCID DEL ASESOR: 0000-0001-8819-7335

DNI (ASESOR): 15725076

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

Biotecnología aplicada a la conservación, sanidad y producción animal - SANIGEN

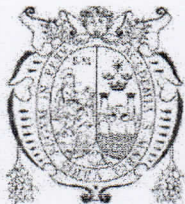
INSTITUCIÓN QUE FINANCIA TOTAL O PARCIALMENTE LA INVESTIGACIÓN:

- Vicerrectorado de Investigación y Posgrado – UNMSM
- Innóvate Perú

UBICACIÓN GEOGRÁFICA DONDE SE DESARROLLÓ LA INVESTIGACIÓN:

Unidad de Biología y Genética Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM.
Lima. Perú

AÑO: 2017 – 2018



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el **viernes 12 de abril de 2019**, a las **10:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0019-EPMV/FMV-2019, integrado por los siguientes profesores:

MV. Mg. Siever Miguel Morales Cauti	Presidente de Jurado
Dr. Blg. Abelardo Maturrano Hernández	Asesor de la Tesis
MV. Dr. Miguel Angel Rojas Montes	Miembro del Jurado
MV. Mg. Juan José Siuce Moreno	Miembro del Jurado

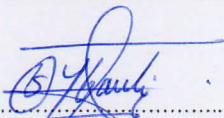
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **DURAN GONZALES, CARLA GABRIELA** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

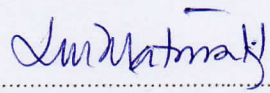
“EVALUACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Salmonella* spp. AISLADAS DE CUYES (*Cavia porcellus*) ENFERMOS Y SANOS”,

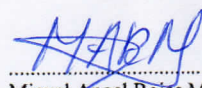
Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

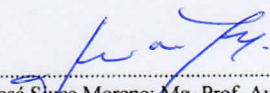
Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **11:35 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


.....
Siever Miguel Morales Cauti, Mg. Prof. Asociado. T.C.


.....
Abelardo Maturrano Hernández: Dr. Prof. Principal. D.E.


.....
Miguel Angel Rojas Montes: Dr. Prof. Auxiliar. T.C


.....
Juan José Siuce Moreno: Mg. Prof. Auxiliar D.E

A mis queridos padres, mi apoyo de toda la
vida, quienes me dan su amor
incondicional.

A mi abuela, quien me regaló mucho cariño
y palabras de ánimo y confianza.

A mis hermanos y amigos, que de alguna
forma u otra me acompañaron en este largo
camino.

AGRADECIMENTOS

Al doctor Lenin Maturrano, mi asesor de tesis, quien confió en mí y me brindó conocimientos y consejos durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al doctor Raúl Rosadio que se preocupa porque todos los integrantes del laboratorio lleven a cabo sus proyectos de la mejor manera.

Al doctor Luis Luna, quien me brindó amistad y me enseñó las técnicas moleculares necesarias en este estudio.

A Guillermo Salvatierra, que a través de los años me brindó amistad, compartió conocimiento y consejos que pude poner en práctica durante este tiempo.

A mis amigos de la Unidad de Biología y Genética Molecular: Raquel, Grecia, Juan, Jorge, Marjorie, Dennis, Marcos, Gerald, Christian, Susana y Laura, gracias por la ayuda y el compañerismo que me demostraron durante el desarrollo de esta investigación.

A Jonathan, Luis, Brandon, quienes me dieron apoyo incondicional en todo momento y a todos los buenos amigos de la facultad, que me alentaron a cumplir mis metas.

A todos ellos, muchas gracias.

El presente estudio fue financiado por el Programa de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innóvate Perú), como parte del proyecto “Desarrollo de una vacuna para el control y prevención de la salmonelosis en la producción de cuyes”, contrato 362-PNICP-PIAP-2014, y por el Programa de Promoción de Tesis de Pregrado del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM, 2^{da} etapa.

InnóvatePerú



VICERRECTORADO DE
INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 GENERALIDADES SOBRE LA PRODUCCIÓN DEL CUY	3
2.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN DE CUYES EN PERÚ..	4
2.2.1 Población y producción nacional	4
2.2.2 Importancia de la producción de cuyes	5
2.2.3 Problemática actual	5
2.3 SALMONELOSIS EN EL CUY.....	6
2.3.1 Características generales	6
2.3.2 Taxonomía.....	7
2.3.3 Factores de virulencia.....	8
2.3.4 Epidemiología	8
2.3.5 Transmisión.....	9
2.3.6 Patogenia	9
2.3.7 Mecanismos de latencia	13
2.3.8 Manifestaciones clínicas:	14
2.3.9 Lesiones.....	15
2.3.9.1 Lesiones anatomopatológicas.....	15
2.3.9.2 Lesiones histopatológicas.....	16
2.3.10 Diagnóstico.....	16
2.3.10.1 Detección microbiológica de <i>Salmonella</i> spp.	17
2.3.10.2 Identificación mediante serotipificación	18
2.3.10.3 Diagnóstico molecular.....	19
2.3.11 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	19
2.3.11.1 Etapas de la PCR.....	20
2.3.11.2 PCR Múltiple.....	21
2.4 DETECCIÓN MOLECULAR DE <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	21
2.4.1 Detección molecular de salmonelosis en cuyes	22

2.4.2	Detección molecular de los factores de virulencia de <i>S. Typhimurium</i>	23
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1	Lugar de ejecución y periodo de duración	27
3.2	Descripción del material experimental.....	27
3.3	Reactivación de cepas	28
3.4	Extracción de ADN.....	28
3.5	PCR Múltiple	29
3.6	Análisis de datos	31
IV.	RESULTADOS.....	32
V.	DISCUSIÓN.....	36
VI.	CONCLUSIONES	44
VII.	RECOMENDACIONES.....	45
VIII.	LITERATURA CITADA.....	46

RESUMEN

El cuy es una especie de producción que se ve afectada principalmente por *Salmonella* Typhimurium, la cual expresa factores de virulencia codificados por diferentes genes, que, en conjunto, cumplen funciones coordinadas para llevar a cabo la patogenia y desarrollar la enfermedad. Por ello, el presente estudio evaluó la presencia de 10 genes codificantes de diversos factores de virulencia de importancia biológica de un total de 100 aislados de *Salmonella* Typhimurium, compuestos por 90 cepas procedentes de cuyes enfermos y 10 cepas procedentes de cuyes aparentemente sanos, confirmados en estudios previos. El ADN de los aislados fue extraído y analizado mediante la técnica de PCR múltiple, para evaluar la presencia de los genes *spvB*, *spiA*, *cdtB*, *sipB*, *tolC*, *sitC*, *lpfC*, *sifA*, *sopB* y *pefA*, obteniéndose un patrón genético similar, con frecuencias de detección variables mayores al 60%, tanto en aislados de cuyes sanos como enfermos, excepto el gen *cdtB*, el cual no fue detectado; concluyéndose que no existe diferencia entre los factores de virulencia presentes en cepas de *Salmonella* Typhimurium aisladas de cuyes enfermos y cuyes aparentemente sanos; sin embargo, debe tenerse en cuenta el potencial peligro que representan los animales portadores dentro de la producción.

Palabras clave: cuy, *Salmonella* Typhimurium, factores de virulencia, PCR Múltiple.

ABSTRACT

The guinea pig is a production animal that is mainly affected by *Salmonella* Typhimurium, which expresses virulence factors encoded by different genes, which together, perform coordinated functions to carry out the pathogenesis and develop the disease. Therefore, the present study evaluated the presence of 10 genes coding for various virulence factors of biological importance of 100 isolates of *Salmonella* Typhimurium, composed of 90 strains from diseased guinea pigs and 10 strains from apparently healthy guinea pigs, confirmed in previous studies. The DNA of the isolates was extracted and analyzed by the multiple PCR technique, to evaluate the presence of *spvB*, *spiA*, *cdtB*, *sipB*, *tolC*, *sitC*, *lpfC*, *sifA*, *sopB* and *pefA* genes, obtaining a similar genetic pattern, with variable detection frequencies higher than 60%, in both healthy and diseased guinea pigs isolates, except for the *cdtB* gene, which was not detected; concluding that there is no difference between the virulence factors present in strains of *Salmonella* Typhimurium isolated from diseased guinea pigs and apparently healthy guinea pigs; however, the potential danger posed by carrier animals within production must be taken into account.

Keywords: guinea pig, *Salmonella* Typhimurium, virulence factors, PCR Multiplex.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Especies, subespecie y número de serotipos de <i>Salmonella</i> ; y su hábitat usual	pág. 7
Cuadro 2.	<i>Primers</i> empleados en la PCC Múltiple para determinar los factores de virulencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	pág. 30
Cuadro 3.	Presencia de genes de virulencia de <i>S. Typhimurium</i> en aislados de Cobayos.....	pág. 34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representación de los estados de patogénesis de la enteritis por <i>Salmonella</i> Typhimurium	pág. 12
Figura 2.	Formación de la vacuola que contiene <i>Salmonella</i> (SCV)	pág. 12
Figura 3.	Signos clínicos de cuyes con Salmonelosis	pág. 15
Figura 4.	Hígado de cuy positivo a <i>Salmonella</i> spp.	pág. 16
Figura 5.	Crecimiento característico de <i>Salmonella</i> spp. en medio selectivo XLD	pág. 32
Figura 6.	Detección de factores de virulencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium aislados de cuyes sanos y enfermos mediante PCR múltiple	pág. 33
Figura 7.	Detección de factores de virulencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium aislados de cuyes sanos y enfermos mediante PCR múltiple	pág. 33

I. INTRODUCCIÓN

El cuy (*Cavia porcellus*), también conocido como cobayo, cuyo, curí, entre otros, es una especie criada ampliamente en el territorio nacional, principalmente por la calidad y alto valor nutricional que aporta a la alimentación del poblador andino (Chauca, 1997). Sin embargo, gracias a las migraciones y el traspaso de costumbres, la carne de cuy viene siendo aceptada en toda la amplitud de nuestro país, de tal manera que en el año 2003 se estimó que su consumo en Perú fue de 0.607 kg por habitante (MINAGRI, 2015).

Sin embargo, como toda explotación pecuaria, sufre pérdidas económicas, principalmente debido a problemas sanitarios, siendo la salmonelosis la más grave, pues causa en el animal alta mortalidad, así como abortos (Chauca, 1997). La presentación de la enfermedad se ve influenciada por el estrés, malas prácticas de manejo y deficiente nivel de bioseguridad con el que se lleva a cabo la producción de cuyes (Matsuura *et al.*, 2010).

En nuestro país, estudios realizados por Marcelo *et al.* (2017), identifican a *Salmonella* Typhimurium en el 100% de cepas aisladas de cuyes con salmonelosis; y tal vez, más importante aún, existe evidencia de la presencia de *S. Typhimurium* aislados de cuyes reproductoras clínicamente sanas, lo que indica que actúan como portadoras y diseminadoras de la enfermedad dentro de la crianza (Chero *et al.*, 2017).

Inicialmente, la infección por *Salmonella* causará lesiones a nivel del intestino para luego diseminarse y adquirir carácter sistémico, siendo necesarios para causar infección productiva en el hospedero, la expresión factores de virulencia, determinados por genes y plásmidos de virulencia, a fin de sobrevivir las condiciones hostiles del medio interno (Saldarriaga y Rugeles, 2001).

Entre los principales factores de virulencia de los serovares de *Salmonella* No Tifoidea (en inglés Non-Typhoidal *Salmonella* o NTS), como es el caso de *Salmonella* Typhimurium, evaluados en el modelo murino se encuentran *spvB*, *invA*, *tolC*, *sopB*, *spiA*, entre otros; los cuales cumplen diversas funciones, entre ellas el reconocimiento, adhesión e invasión de la célula blanco, supervivencia dentro del Macrófago o incluso la muerte de éste; gracias a la acción de éstos, se determinará el desarrollo y mantenimiento de la enfermedad (Skyberg *et al.*, 2006) por ello, es importante conocer las diferencias genéticas entre cepas, las cuales podrían estar relacionadas con variaciones en la presentación de la patogénesis de la salmonelosis en cuyes.

Mediante éste estudio se evaluaron la presencia de genes, que codifican a los factores de virulencia, de capacidad patogénica en aislados de *Salmonella* Typhimurium de cuyes aparentemente sanos y enfermos; y si su presentación guarda relación con estado de salud o enfermedad.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 GENERALIDADES SOBRE LA PRODUCCIÓN DEL CUY

El cuy (*Cavia porcellus*), es un roedor originario de la región andina de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú (Padilla, 2006). Su aparición data desde hace aproximadamente 2500 a 3600 años, por lo que, previo a la conquista española, los nativos de los Andes ya criaban estos animales y consumían su carne (INIA, 1995). Actualmente, el consumo de carne de cuy se concentra principalmente en las ciudades de la Sierra; sin embargo, debido a las migraciones hacia la costa y selva y el traspaso de costumbres, la carne de cuy viene siendo aceptada en éstas regiones. Para el año 2003, el consumo de carne de cuy en Perú se estimó en 0.607 kg por habitante, superando solamente al consumo de carne de caprino, de 0.25 kg por habitante por año (MINAGRI, 2015).

La principal forma de crianza en el Perú es la familiar, caracterizada por mantener a los animales dentro del hogar, y alimentándolos con insumos cotidianos. Los cuyes reciben cuidados de los miembros de la familia, principalmente mujeres y niños, los cuales tienen escaso manejo y los mantienen en un solo grupo, sin diferenciar por clase,

estrato etario, sexo; que trae como consecuencia poblaciones con alto grado de consanguinidad, con mayor susceptibilidad a enfermedades (Chauca, 1997).

2.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN DE CUYES EN PERÚ

La población de cuyes en los países andinos comprende alrededor de 36 millones de animales, siendo Perú y Ecuador países en los cuales la crianza alcanza casi la totalidad de sus territorios; mientras que Bolivia y Colombia presentan producción solo en determinados departamentos, lo cual explica la menor distribución de animales en estos países (MINAGRI, 2015).

2.2.1 Población y producción nacional

Debido a su capacidad de adaptación a la diversidad de climas, los cuyes pueden encontrarse desde la costa hasta alturas superiores a los 4500 m.s.n.m. tanto en zonas frías como cálidas (Chauca, 1997).

En el informe del IV Censo Nacional Agropecuario de año 2012, se estimó que la población de cuyes se encontraba conformada por 12 695 030 animales aproximadamente; distribuidos en su mayoría en la sierra, seguido por la costa y en mucha menor proporción la selva; así mismo, los principales departamentos productores de cuyes son Ancash, Apurímac, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Junín, La Libertad y Lima (MINAGRI, 2015).

En el año 2016, el Gobierno Regional del Cusco informó acerca de la producción de Carne de cuy, la cual registró 134 255 unidades, con un aproximado de 115.41 toneladas de peso vivo; sin embargo, se registró la disminución en la producción con respecto al año anterior, la cual sumó 119.29 toneladas, debido al estancamiento de la demanda de carne de cuy en los mercados.

2.2.2 Importancia de la producción de cuyes

La importancia de la crianza y producción de cuyes radica en el valor nutricional de su carne, la cual es magra, con menos del 10% de grasa, alto contenido proteico (20.3%) y bajo contenido en colesterol y sodio. Otro aspecto importante relacionado a la producción son las ganancias que se obtienen, debido a la creciente demanda de su carne sumado a las mejoras genéticas las cuales convierte a este animal en una especie eficiente en la conversión de alimentos, precoz y prolífico (Gil Santos, 2007).

El tipo de crianza es importante para el productor, ya que en el país predomina la crianza tipo familiar, la cual lo favorece puesto que se obtiene ingresos de la venta de animales, y a su vez cubre los requerimientos alimenticios de su familia, 44.6% de productores crían cuyes exclusivamente para el autoconsumo, mientras que el 49.6% comercializan los excedentes para generar ingresos (MINAGRI, 2015).

Otras ventajas de la crianza de cuyes incluyen la facilidad de adaptación a diferentes ecosistemas, ciclo reproductivo corto, alimentación versátil, la cual, al ser herbívora, permite la utilización de insumos no competitivos con la alimentación de otros monogástricos (Chauca 1997).

2.2.3 Problemática actual

Como ha sido mencionado antes, la crianza de cuy como animal de abasto es una práctica muy antigua, la cual se ha distribuido a lo largo del territorio andino. En la actualidad, existen gran cantidad de granjas que crían y comercializan cuyes; sin embargo, éstas suelen realizar prácticas informales, por lo que no se lleva a cabo un buen desarrollo de la producción (Chirinos *et al.*, 2009).

Estas prácticas informales se relacionan con las áreas rurales, en las que se lleva a cabo un sistema familiar-comercial, donde no se cuenta con medidas preventivas frente

posibles riesgos sanitarios o no se instauran tratamientos adecuados frente a los casos en los que se ve afectada la salud de los cuyes, todo ello influenciado de manera directa por la falta de recursos del poblador (Matsuura *et al.*, 2010; Chirinos *et al.*, 2009).

Es por ello, que la problemática que afecta el desarrollo de la producción de cuyes gira en torno al aspecto sanitario, siendo la salmonelosis la principal enfermedad infecciosa causante de morbi-mortalidad de su población, en la actualidad (Chauca, 1997).

La presentación de la enfermedad puede ser aguda, la cual produce mortalidad en el transcurso de 24 a 48 horas; en muchos casos, sin presentar signos clínicos previamente (Ramírez, 1972, Padilla, 2006); mientras que la forma crónica cursa con diversos signos, principalmente se observa decaimiento, diarreas, pérdida de la condición corporal, parálisis del tren posterior, abortos, entre otros (Layme *et al.*, 2011).

2.3 SALMONELOSIS EN EL CUY

2.3.1 Características generales

El agente etiológico causante de la enfermedad es *Salmonella* sp., que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, estos son bacilos gramnegativos con diámetro de 0.7 – 1.5 μm y largo de 2 – 5 μm , anaerobios facultativos no capsulados y no esporulados; generalmente móviles debido a la presencia de flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*), utilizan citrato como única fuente de carbono; así mismo, poseen metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo, con producción de gas. Son oxidasa negativos y la mayoría producen sulfuro de hidrógeno, con excepción de *Salmonella* Paratyphi A y *Salmonella* Typhi, que es débil productora (CFSPH, 2005; PHE, 2015). Las diferentes especies de *Salmonella* spp. crecen a temperaturas que van desde 5°C a 47°C, con pH óptimo entre 6.5 y 7.5. Su crecimiento se detiene completamente a temperaturas menores a 7°C y pH menor a 3.8 (Gonzales Pedraza *et al.*, 2014).

2.3.2 Taxonomía

Actualmente, *Salmonella* se clasifica en dos grupos: *Salmonella entérica*, compuesta por 6 subespecies designadas con números romanos (I, *S. enterica* subesp. *enterica*; II, *S. enterica* subesp. *salamae*; IIIa, *S. enterica* subesp. *arizonae*; IIIb, *S. enterica* subesp. *diarizonae*; IV, *S. enterica* subesp. *houtenae* y VI, *S. enterica* subesp. *indica*) (Brenner, 2000); y *Salmonella bongori* (Brenner *et al.*, 2000; Gonzales *et al.*, 2014). Este sistema de clasificación es el usado por Organización mundial de la Salud (OMS), el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) y otras organizaciones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Especies, subespecies y número de serotipos de *Salmonella*; y su hábitat usual.

Especie y subespecie de <i>Salmonella</i>	N° de serotipos dentro de la especie	Hábitat usual
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1531	Animales de sangre caliente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	505	Animales de sangre fría y ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	99	
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	336	
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73	
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13	
<i>S. bongori</i> (V)	22	Animales de sangre fría y ambiente
TOTAL	2579	

Adaptado de Grimont y Weill, 2007

A su vez, cada subespecie se encuentra dividida en serotipos o serovares, a consecuencia de la asociación de factores antigénicos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi), basada en el esquema de Kauffmann-White (Flores, 2003). Hasta la fecha han sido identificados más de 2.500 diferentes serotipos de *Salmonella* (Gonzales *et al.*, 2014). En caso de cuyes, *Salmonella* ser. Typhimurium es el serotipo causante de enfermedad más común (Casart y Falconí, 2016).

Las serovariedades varían en su distribución. Algunas, como la *Salmonella* ser. Enteritidis y la *Salmonella* ser. Typhimurium, se encuentran en todo el mundo. (CFSPH, 2005)

2.3.3 Factores de virulencia

Salmonella Typhimurium percibe y responde según las condiciones medioambientales en que se desarrollan; en este caso, el medio interno hostil del hospedero, que viene a ser el tracto gastrointestinal. Este se caracteriza por poseer una baja presión de oxígeno, así como por su hiperosmolaridad. Estas “señales medioambientales” estimulan la expresión de genes que codifican diversos factores de virulencia, los cuales permiten su interacción con la célula hospedero y el desarrollo de la patogenicidad del agente. Algunos factores se relacionan a la fagocitosis, la manifestación del proceso patológico, entre otras funciones (Saldarriaga y Rugeles, 2001; Murugkar *et al.*, 2003).

El modelo murino ha sido muy importante para comprender el desarrollo de la salmonelosis, la cual se presenta en los ratones como una infección sistémica causada por *Salmonella* Typhimurium. Con ello, se han identificado aproximadamente 500 genes únicos, los cuales son responsables de la expresión de los factores de virulencia (Skyberg *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2018).

2.3.4 Epidemiología

La salmonelosis se ha convertido en uno de los mayores desafíos para la salud pública, debido a su amplia distribución en el medio ambiente, especies de aves, mamíferos, reptiles y anfibios (CFSPH, 2005).

Un aspecto importante de *Salmonella* radica en su carácter zoonótico; se ha estimado que la incidencia en Estados Unidos es de 1.4 millones de personas enfermas y 600

muerdes anualmente, siendo la mayoría de casos de origen alimentario (Hendriksen *et al.*, 2004).

Dentro de la llamada *Salmonella* No Tifoidea (NTS), *Salmonella* Typhimurium es el principal agente que causa infección en un amplio rango de hospederos, la cual se presenta comúnmente como gastroenteritis, seguida por bacteriemia y fiebre entérica (Eng *et al.*, 2015; Branchu *et al.*, 2018).

2.3.5 Transmisión

La transmisión de *Salmonella* es horizontal, vía fecal – oral, los animales pueden infectarse consumiendo agua o alimentos contaminados, o por contacto directo con animales infectados. Las aves y los roedores pueden propagar la *Salmonella*, al igual que los fómites y los insectos que actúan como vectores mecánicos. En las especies hospederos, el tracto gastrointestinal se ve comprometido solo en estadios tardíos de la enfermedad, y en ausencia de enfermedad ocurre una pequeña colonización intestinal en la región (CFSPH, 2005, Sterzenbach *et al.*, 2012).

El estudio realizado por Chero *et al.* (2017) identificó *Salmonella* Typhimurium y *S. Enteritidis* en cuyes reproductoras, donde detectó que el 2.94% de “animales aparentemente sanos” resultaron positivos a *Salmonella* Typhimurium, en un criadero sin presentación de brotes en cuatro años, por lo que podría tratarse que las hembras hayan superado la infección y se comporten como portadoras asintomáticas.

2.3.6 Patogenia

Salmonella ingresa vía oral, por consumo de agua o alimento contaminados. Estas bacterias atravesarán el tubo digestivo, siendo este un medio que carece de oxígeno, presenta alta osmolaridad y posee pH alcalino. Para sobrevivir a los cambios en el medio, *Salmonella* spp. debe modular la expresión de sus genes, los cuales codifican proteínas

necesarias para el establecimiento y desarrollo de la infección; de igual manera, ciertos factores relacionados al hospedero (como la edad, genética, estado inmune, enfermedades recurrentes, entre otros.), influyen directamente sobre el desarrollo de la enfermedad (Saldarriaga y Rugeles, 2001, Branchu *et al.*, 2018).

La bacteria ocupa el lumen del intestino delgado para luego asentarse en éste. La interacción entre el hospedero y el patógeno se llevará a cabo en las células M de las placas de Peyer (López *et al.*, 2012), donde serán captadas por células fagocíticas y transportadas a los nódulos mesentéricos, hígado y bazo. Dentro de estos órganos, *Salmonella* puede replicarse y sobrevivir dentro de los macrófagos, siendo posible su diseminación sanguínea, seguida por bacteriemia y diseminación sistémica (Kuhle y Hensel, 2004).

La patogenia de *Salmonella* se desarrolla en diferentes pasos, siendo el inicial la adhesión; en éste intervienen las Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (SPI), que codifican Sistemas de Secreción Tipo III (SST3), los cuales se encuentran conformados por una compleja asociación de proteínas de unión a membrana, la cual secreta proteínas efectoras en el interior de la célula blanco, como *SipA*, *SipC*, *SopB*, entre otras, que inducen modificaciones del citoesqueleto para que se lleve a cabo la internalización de la bacteria. Una vez internalizada, *Salmonella spp.* sobrevive y se replica dentro de un fagosoma modificado conocido como la SCV (*Salmonella*-containing vacuoles) (Figura 1) (Ibarra *et al.*, 2009).

La formación de la vacuola implica tres estadios, que son: temprano, intermedio y tardío. En el estadio temprano, la vacuola presenta varios marcadores endosomales tempranos, en el estadio intermedio ocurre un cambio a nivel de la membrana acompañado de disminución de pH luminal y redistribución yuxtannuclear de la misma. En el estadio tardío, se lleva a cabo la replicación bacteriana y la elongación centrífuga

de los microtubulos (Steele – Mortimer, 2008). Este evento ocurre en el último estadio debido a que la vacuola ha incorporado suficientes nutrientes producto del transporte endocítico y exocítico llevado a cabo en el aparato de Golgi (Figura 2) (López *et al.*, 2012).

Durante la infección por *Salmonella* ocurre la atracción de Neutrófilos al área comprometida del intestino lo que trae como consecuencia modificaciones en la secreción de electrolitos, así como la inducción de citocinas y factores quimiotácticos (Figura 1) los cuales inducirán la activación de Macrófagos y su migración (Barrow *et al.*, 2010).

La acidificación del fagosoma, activación de proteínas catiónicas y producción de defensinas favorece la supervivencia dentro del macrófago y la multiplicación dentro de éstas células mononucleares fagocíticas (Figura 1). De esta manera, las bacterias son arrastradas al flujo sanguíneo (López *et al.*, 2012, Kaur y Jain, 2012).

Durante la bacteriemia ocurre la diseminación hacia diferentes órganos (Figura 1); los linfocitos B y T, provenientes de los linfonódulos, alcanzan el hígado y vejiga mediante el sistema retículo endotelial, otros órganos donde ocurre infección secundaria se encuentran la vesícula biliar, médula ósea y las placas de Peyer del Íleon. A nivel hepático, *Salmonella* invade los hepatocitos y causa muerte celular, estimulando la apoptosis (Kaur y Jain, 2012).

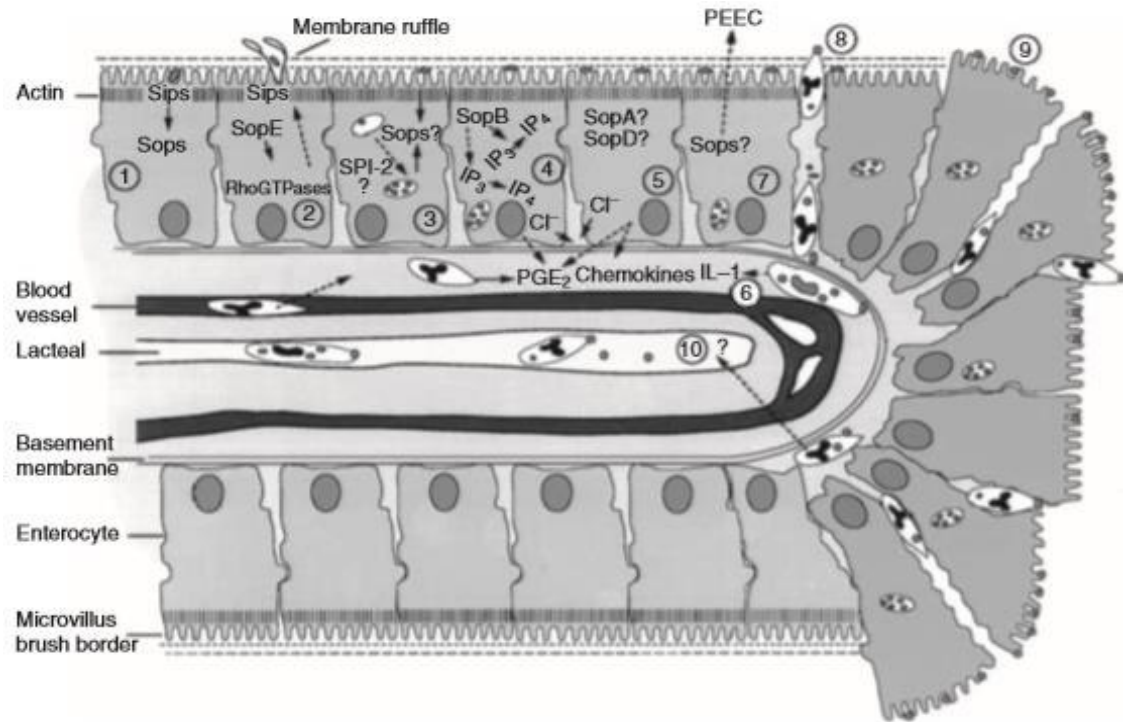


Figura 1. Representación de los estados de patogénesis de la enteritis por *Salmonella Typhimurium*. (1) Interacción con enterocitos e ingreso de proteínas *Sop* mediante SST1. (2) Proteínas *Sip* y *Sop* inducen el rizado de la membrana e invasión. (3) Bacteria en vesículas formadas por la membrana. (4) *SopB* afecta la señalización de inositol fosfatos ocasionando pérdida de electrolitos y secreción de fluidos; (5) células epiteliales infectadas secretan quimiocinas atrayendo células inflamatorias al lugar de infección. (6) La interacción de *Salmonella* con células inflamatorias incrementa el estímulo de citoquinas proinflamatorias, (7) estimulación de migración transepitelial de granulocitos, (8) fagocitosis de *Salmonella* por células inflamatorias; (9) Extrusión de enterocitos infectados de la superficie, reduciendo la capacidad de absorción, (10) migración de macrófagos infectados y bacterias por vías linfáticas, diseminación sistémica. Barrow *et al.*, 2010.

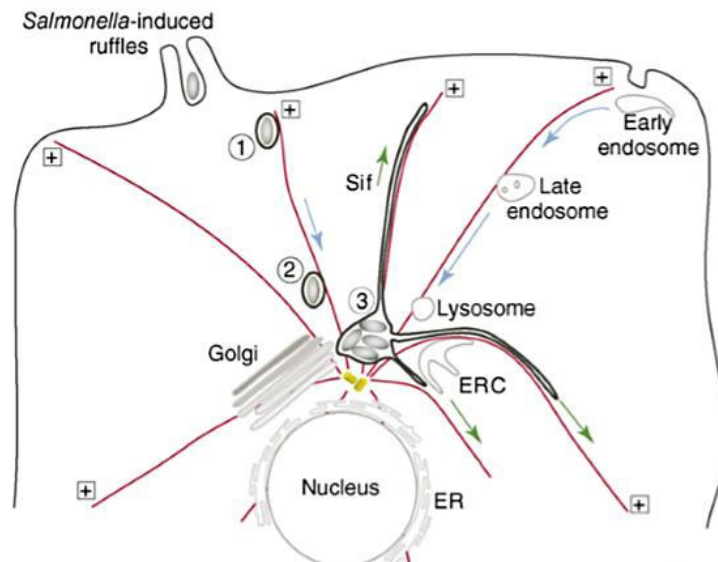


Figura 2. Formación de la vacuola que contiene *Salmonella* (SCV). (1) Estadio temprano. (2) Estadio intermedio. (3) Estadio tardío. Steele – Mortimer, 2008.

2.3.7 Mecanismos de latencia

En algunas especies, *Salmonella* puede ser eliminada en las heces por periodos largos de tiempo, causando infecciones asintomáticas persistentes; por lo que a estos animales se les conoce como portadores latentes. Estos portadores actúan como reservorios naturales de *Salmonella*, y son responsables de su liberación intermitente, contaminando la cadena alimentaria y el medio ambiente (Maciel *et al.*, 2017).

En el caso de *Salmonella* Typhimurium, tiene un amplio rango de hospederos, por lo que causa enfermedad en diversas especies; sin embargo, en el ratón puede causar una enfermedad similar a la tifoidea (Monack, 2012).

El desarrollo de infecciones experimentales en ratones ha demostrado que al igual como ocurre con *S. Typhi* en humanos, *S. Typhimurium* puede encontrarse en la vesícula biliar de animales que desarrollan la enfermedad, ya sea de curso agudo o crónico (Menéndez *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que *Salmonella* spp. puede mantenerse viable en una superficie formando biofilms o biopelículas, los cuales son agrupamientos de bacterias embebidos en una matriz polimérica de su propia producción que se adhiere en superficies vivas o inertes, con la finalidad de proteger a los microorganismos del estrés medioambiental, antibióticos, desinfectantes e incluso del sistema inmune; por lo que son difíciles de erradicar, ya que actúan como mecanismos de persistencia (Steenackers *et al.*, 2012); esto fue demostrado por Gonzalez-Escobedo y Gunn (2013), en un estudio en el cual *S. Typhimurium* fue capaz de formar biofilms en cálculos biliares de colesterol, dentro de la vesícula biliar de ratones.

Adicional a ello, *S. Typhimurium* puede mantenerse en estado de “dormancia”, lo cual fue demostrado por Helaine *et al.* (2010), al evaluar macrófagos de médula ósea

provenientes de ratones anteriormente infectados. Para determinar la viabilidad de las bacterias presentes en los macrófagos, se evaluó la expresión de fluorescencia como marcador de estado de replicación y actividad metabólica. Se obtuvo que algunas bacterias expresaban fluorescencia, demostrando que, tras la fagocitosis por los macrófagos, *S. Typhimurium* entra en un estado no replicante, pero si viable. Posteriormente, fue con firmado por Monack (2012), que evaluó la persistencia de *S. Typhimurium* en ratones, mediante la recuperación de la bacteria procedente de diversos órganos de animales asintomáticos, después de un año de haberlos infectado y desarrollado la enfermedad de tipo crónica.

2.3.8 Manifestaciones clínicas:

Si bien, *Salmonella* spp. puede causar diferentes signos clínicos entre las diversas especies a las cuales afecta, los serotipos aislados más frecuentes en cuyes son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* (Iijima *et al.*, 1987, Bartholomew *et al.* 2014).

En el cuy, la sintomatología puede manifestarse de forma aguda o crónica. La forma aguda, causa alta mortalidad en la población en corto tiempo (24 a 48 horas); mientras que en cuadros crónicos la sintomatología suele ser más marcada, con presencia de caquexia, anorexia, diarrea, debilidad, parálisis de miembros, neumonía, abortos, aumento del volumen del vientre por ascitis, entre otros (Figura 3). La afección de la mayoría de los órganos sugiere su carácter septicémico (Chauca, 1997; Matsuura *et al.*, 2010).

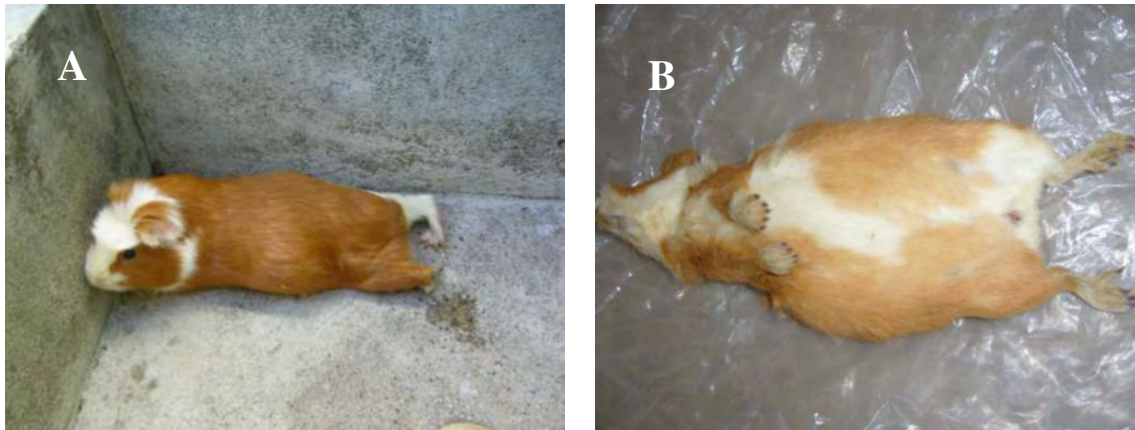


Figura 3. Signos clínicos de cuyes con Salmonelosis. A) Parálisis del tren posterior. B) Dilatación del abdomen por ascitis. Tomado de Layme *et al.*, 2011.

2.3.9 Lesiones

2.3.9.1 Lesiones anatomopatológicas

A la necropsia, se puede observar hepatomegalia, así como focos blanquecinos, necróticos distribuidos difusamente en la superficie del órgano (Figura 4). El bazo presenta esplenomegalia con focos purulentos en su superficie. La mucosa intestinal muestra congestión y hemorragia, así como abscesos que sobresalen de la superficie del órgano a manera de perlas, lo cual se asocia a la hipertrofia de las placas de Peyer. Los linfonódulos mesentéricos presentan aumento de tamaño y congestión (Chauca, 2007).

Lo descrito por Layme *et al.* (2011), demuestra que el principal órgano afectado es el hígado, posiblemente por el tropismo por parte de la bacteria hacia órganos linfoides; la frecuencia de lesiones fue de 87.7% para el hígado, 66.7% para el intestino, 58% para los pulmones y 51.9% para el bazo. Con respecto al hígado, éste presentó como lesión principal inflamación y exudado más frecuente el necrótico.

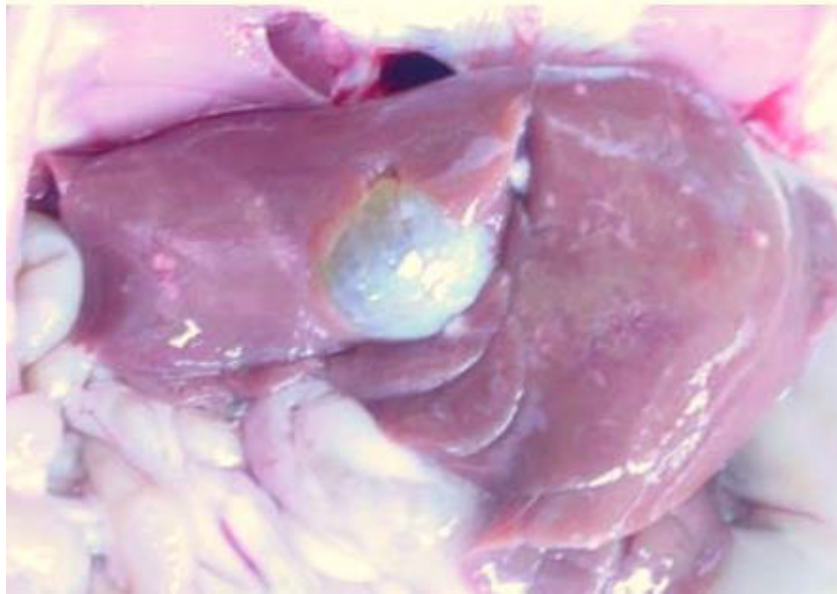


Figura 4. Hígado de cuy positivo a *Salmonella* spp. Presenta hepatomegalia y focos blanquecinos distribuidos difusamente en el parénquima, compatible con hepatitis necrótica multifocal. Layme *et al.*, 2011.

2.3.9.2 Lesiones histopatológicas

Nakoneczna y Hsu, (1980), evidenciaron histológicamente las lesiones microscópicas causadas por *Salmonella* spp. en roedores. Se describió congestión y exudado de los hepatocitos y pequeñas áreas de necrosis, los cuales presentaron infiltrado de polimorfonucleares (PMNs). Los vasos sanguíneos hepáticos, como la vena Portal o la central, presentaron vasculitis agudas, así como trombos no oclusivos. A nivel del bazo, este presentó focos de necrosis diseminados en la pulpa roja y blanca, con infiltración de PMNs. A partir del sexto día las lesiones del hígado y bazo se volvieron alargadas, con células mononucleares en la periferia, mientras que los PMNs se ubicaron al centro de la lesión. La infiltración de células mononucleares generó la transformación de microabscesos a granulomas, que se hacen visibles a los 6 o 7 días.

2.3.10 Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico de salmonelosis en cuyes se llevan a cabo correlacionando los signos clínicos presentados, hallazgos en la necropsia y el aislamiento

e identificación bacteriana (Matsuura *et al.*, 2010), siendo el método mayormente utilizado el cultivo microbiológico, el cual expresa un resultado cualitativo; sin embargo, las evaluaciones actuales requieren de datos cuantitativos para poder estimar el riesgo de poblaciones a contagio de salmonelosis; por ello que son usados nuevos métodos diagnósticos, para optimizar los procesos de vigilancia epidemiológica (González Pedraza *et al.* 2014).

2.3.10.1 Detección microbiológica de *Salmonella* spp.

El procedimiento para aislar *Salmonella*, se lleva a cabo de la siguiente manera:

Pre enriquecimiento no selectivo:

Este procedimiento busca normalizar metabólicamente las células de *Salmonella*, para su desarrollo y competencia con otros microorganismos. Se realiza en medios de cultivo no selectivos, como agua peptonada, incubándolo a 37°C por 24 a 48 horas (González Pedraza *et al.* 2014).

Enriquecimiento selectivo:

Esta etapa estimula el desarrollo de *Salmonella*, inhibiendo el crecimiento de microbiota residente; para ello, son utilizados diferentes caldos, entre ellos el Caldo Tetrationato Bilis Verde Brillante, Selenito Cistina, y el más utilizado, Rappaport Vasiliadis (RV). Se transfiere 0.1 ml de cultivo obtenido del enriquecimiento no selectivo a un tubo con caldo RV y se deja incubando el inóculo a 42°C durante 24 horas (González Pedraza *et al.* 2014; Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella* spp., 2002).

Aislamiento en medios selectivos:

Esta etapa permite diferenciar colonias de *Salmonella* de otros patógenos entéricos. Para aislar y diferenciar las colonias se emplean medios específicos, como el agar XLD

(Xilosa Lisina Desoxicolato), agar Salmonella Shigella (SS), Hektoen, entre otros. Luego de la incubación en medio selectivo, se procede a sembrar por agotamiento la superficie del agar específico e incubación por 24 horas a 37°C (González Pedraza *et al.* 2014; Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella* spp., 2002).

En agar XLD; las colonias se observan negras o rojas, con presencia de punto negro central, lo que demuestra la producción de sulfuro de hidrógeno, rodeadas por una zona clara de color rosado, debido a la descarboxilación de la lisina; en agar SS (Salmonella-Shigella), las colonias son incoloras, con el punto negro central debido a la detección de la producción de sulfuro de hidrógeno; en agar Hektoen, se observan las colonias verde azuladas con centro negro, debido a que *Salmonella* no fermentan los carbohidratos que lo componen y no ocasiona cambios de color en el sistema indicador de pH, pero sí se detecta la producción de sulfuro de hidrógeno (González Pedraza *et al.* 2014).

Pruebas bioquímicas:

Los medios básicos utilizados para identificar *Salmonella* son Triple Azúcar Hierro (TSI), el cual obtiene como resultado alcalino/ácido (K/A); Agar Lisina Hierro (LIA), cuyo resultado es alcalino/alcalino (K/K); Úrea (U) de resultado negativo y SIM, cuyos resultados son motilidad positiva e Indol negativo (Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella* spp., 2002).

2.3.10.2 Identificación mediante serotipificación

El género *Salmonella* se divide en dos especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*. Que a su vez se dividen en subespecies, nombradas bajo números romanos. La serotipificación divide las subespecies en subtipos o serovares, por caracterización inmunológica de dos estructuras de superficie: el polisacárido O (Antígeno O), y la proteína flagelina (Antígeno H) y el Antígeno capsular, éste último solo poseído por

algunos serovares. El polisacárido capsular o Antígeno O (Ag O) mejora la resistencia de disminuyendo la superficie de expresión de patrones moleculares asociados a patógenos (McQuiston *et al.*, 2011).

El antígeno capsular Vi facilita la supervivencia y diseminación extracelular a través del flujo sanguíneo, reduciendo la acción del complemento sobre la superficie bacteriana y facilitando la evasión del sistema inmune innato y bacteriólisis (Looney y Steigbigel, 1986).

La serotipificación se lleva a cabo siguiendo el esquema de Kauffman-White, dentro de éste; *Salmonella* posee 67 serogrupos o grupos O, que se clasifican en más de 2500 serotipos diferentes en función de la combinación de antígenos O y H de cada organismo. Este procedimiento implica la mezcla del microorganismo sospechoso con antisuero que contenga antisueros específicos para *Salmonella*, si ocurre aglutinación en presencia del antisuero homólogo, esto indicará la presencia de antígeno (Grimont y Weill, 2007).

2.3.10.3 Diagnóstico molecular

Los métodos modernos de identificación de agentes se basan en la caracterización del genotipo de los organismos; así, la tipificación molecular de aislados es una herramienta importante para conocer el origen de la infección; además de ello, los métodos de genotipificación son menos susceptibles a las variaciones naturales responsables de modificaciones genéticas o mutaciones aleatorias (Nwabor *et al.*, 2015).

2.3.11 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica rápida, sensible y específica usada para amplificar de manera exponencial segmentos de ADN. Ésta técnica *in vitro* amplifica millones de veces una secuencia de ADN genómico durante varios ciclos repetidos haciendo uso de la actividad enzimática de la ADN polimerasa, la cual

sintetiza naturalmente el ADN de las células. El requisito fundamental para realizar la reacción es disponer de fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar; éstos servirán como cebadores, de esta manera, la enzima polimerasa podrá incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. La ventaja principal de la PCR es que permite generar millones de copias de la región de interés a partir de poca cantidad de ADN molde, debido a la capacidad de los oligonucleótidos (*primers*) de unirse específicamente a sus secuencias complementarias de ADN, mientras que la desventaja radica en la necesidad de estandarizar la técnica para amplificar genes del organismo de interés, lo cual puede ser un proceso largo y costoso (Sandoval *et al.* 2013, Viljoen *et al.*, 2005).

2.3.11.1 Etapas de la PCR

Para desarrollar la PCR, deben llevarse a cabo en ciclos consecutivos con condiciones específicas, las cuales son detalladas a continuación.

Desnaturalización:

En esta etapa, las cadenas de ADN son expuestas a altas temperaturas, en la cual llegan a ser separadas a muy altas temperaturas, entre 90 – 97 °C, durante 20 a 30 segundos, con el fin de romper los puentes de hidrógeno ; el tiempo dependerá de la secuencia del templado, si la cantidad de G-C es alta, se necesitará más tiempo para romper las uniones conformadas por tres enlaces, caso contrario al de las bases A-T, que será menor debido a que solo presentan dos enlaces (Viljoen *et al.*, 2005)

Hibridación:

Una vez separadas las cadenas de ADN, los *primers* se alinearán a los sitios específicos complementarios de las cadenas simples de la región que se va a amplificar; para ello, la temperatura debe descender entre 40 y 60°C. Para que se forme el complejo

templado-primer, es muy importante en esta fase que la temperatura de *melting* sea la óptima (Viljoen *et al.*, 2005).

Extensión:

Durante esta etapa, la *Taq* Polimerasa actúa sobre el complejo templado-primer, haciendo una función catalítica a rápida velocidad, mientras agrega dNTP's complementarios para crear cadenas completas de ADN, por lo general a 72°C. Al finalizar el ciclo, se habrán formado amplicones con un tamaño regido por el número total de pares de bases (pb) (Viljoen *et al.*, 2005).

Estas etapas se repiten sucesivamente, amplificándose en cada ciclo la región de interés de las cadenas complementarias; para obtener concentraciones exponenciales de los productos amplificados (Viljoen *et al.*, 2005).

2.3.11.2 PCR Múltiple

La PCR múltiple sigue las mismas etapas que la PCR convencional, pero busca amplificar simultáneamente en un único tubo distintas secuencias específicas, para ello es necesario que los reactivos mezclados y el protocolo utilizado sean suficientes y adecuados para permitir la detección de cada gen. Con esto, es necesario tener en cuenta algunos aspectos; como el escoger oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, que los *primers* tenga temperaturas de *annealing* similares, que cada pareja (*forward* y *reverse*) amplifique una secuencia diana, y que sea generados amplicones de tamaño diferentes para ser separados y analizados posteriormente (Méndez y Pérez, 2004).

2.4 DETECCIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* Typhimurium

Debido a que existen más de 2600 serovares de *Salmonella* con potencial infeccioso en un amplio rango de hospederos, es necesaria la subtipificación pues ésta sólo se logra

en un reducido porcentaje de brotes, de los cuales, la mayoría de veces corresponde a los serotipos Enteritidis y Typhimurium (Barreto *et al.*, 2016; Yoshida *et al.*, 2016).

Clásicamente, *Salmonella entérica* ha sido identificada de acuerdo a métodos fenotípicos, como el cultivo microbiano y la caracterización bioquímica, pero al ser un proceso laborioso y largo, actualmente se hace uso de métodos genotípicos cuyo desarrollo resulta más fácil de realizarse (Wattiau *et al.*, 2011; Chiu y Ou, 1996). Dentro de estos métodos se halla la PCR, la cual optimiza el tiempo de detección y lo reduce a 24 o 48 horas, de la cual se obtienen productos para el reconocimiento de genes específicos de *Salmonella spp* (Luigi *et al.*, 2015).

Es por ello que diversos estudios para detectar *Salmonella* Typhimurium se llevan a cabo mediante éstas técnicas o sus variantes; es el caso de Jamshidi *et al.* (2010), quien aisló e identificó *Salmonella* Typhimurium y *S. Enteritidis* de muestras de huevos de tiendas locales de Mashhad (Irán), empleando el método microbiológico convencional y la técnica de PCR Múltiple; de igual manera, Paião *et al.* (2013), llevó a cabo la técnica de PCR Múltiple para detectar la presencia de *Salmonella spp.*, *Salmonella* Enteritidis y *S. Typhimurium* en broilers naturalmente infectados.

2.4.1 Detección molecular de salmonelosis en cuyes

La crianza del cuy se ve afectada por las deficiencias de manejo y sanidad, lo que se traduce en mayor presentación de enfermedades, siendo la Salmonelosis la más importante (Matsuura *et al.*, 2010). Como es sabido, los métodos microbiológicos clásicos implican muchos pasos, los cuales lo vuelven un proceso laborioso, con resultados que tardan días o semanas, y, además, presentan baja sensibilidad, por lo que se hacen necesarios otros métodos de detección (Palomino Camargo y González Muñoz, 2014).

Díaz *et al.* (2017), evaluó una técnica de PCR múltiple para la detección rápida de *Salmonella* Typhimurium en cuyes naturalmente infectados, a partir de muestras sometidas a enriquecimiento no selectivo (Agua peptonada tamponada – APT) en comparación con el aislamiento y detección microbiológico convencional. Los resultados de la PCR se obtuvieron al día 2, mientras que los del método convencional al día 4, ambos con incubación previa de 24 horas en medio no selectivo. Del análisis se obtuvo que la técnica de PCR múltiple detectó al patógeno en un 25% más de muestras que la técnica convencional.

Estudios realizados por Marcelo *et al.* (2017), se basaron en la identificación de *Salmonella* Enteritidis y *S. Typhimurium* de cuyes mediante métodos moleculares (PCR Múltiple). Del análisis realizado a las muestras, el 100% de mostró amplicones de 559 pb, al igual que los controles positivos para *Salmonella* Typhimurium. Esto coincide con el estudio realizado por Chero *et al.* (2017) el cual identificó *Salmonella* Typhimurium en cuyes reproductoras primerizas clínicamente sanas mediante PCR múltiple, con una prevalencia de 2.9%; así mismo, se planteó que estos cobayos positivos sin signología clínica podrían actuar como portadores y diseminadores del patógeno.

2.4.2 Detección molecular de los factores de virulencia de *Salmonella* Typhimurium

El proceso patogénico en la Salmonelosis es dictado por una agrupación de genes que actúan de manera coordinada para finalmente manifestar la signología, ya que éstos codifican productos que asisten al patógeno a expresar su virulencia en la célula hospedero (Murugkar *et al.*, 2003).

Los genes de virulencia se localizan en el cromosoma o en plásmidos, donde la mayoría de éstos se ubican en clusters, principalmente en las Islas de Patogenicidad de *Salmonella*– SPI; y su finalidad es codificar factores solubles que modifican la fisiología

celular del hospedero o protegen a la bacteria de la acción antimicrobiana (van Asten y Van Dijk, 2005; Martínez, 2007).

Diversos trabajos realizados en aislados de *S. Typhimurium* de diversas especies animales han sido realizados con el fin de describir qué genes de virulencia podrían estar involucrados en procesos de enfermedad. Por ejemplo, Skyberg *et al.* (2006), describe la detección de diversos factores de virulencia presentes en *S. Typhimurium* aislados de aves aparentemente sanas y clínicamente enfermas, entre los cuales los genes *spiA*, *sipB*, *tolC* y *sitC* se halló en el 100% de aislados tanto de aves enfermas y sanas, el gen *spvB* fue hallado en el 5% de aves sanas y en el 10% de aves enfermas, los genes *lpfC*, *sifA* y *sopB* fueron hallados en el 90% de aislados de aves sanas y enfermas, y el gen *pefA* fue hallado apenas en el 3% de los aislados de aves sanas y 10% de aves enfermas, concluyendo que estos factores de virulencia están ampliamente extendidos en cepas aisladas tanto de aves sanas y enfermas. Similares resultados en aislados de *S. Typhimurium* de aves fueron reportados por diversos autores (Mezal *et al.*, 2014, Krawiec *et al.*, 2015). En aves silvestres (paseriformes), fueron detectados en el 100% de aislados de *S. Typhimurium* los genes *sipB*, *spiA*, *tolC*, *sopB*, *sifA* y *sitC* (Mather *et al.*, 2016).

En cerdos, Tamang *et al.* (2014), halló que el 96% de aislados de *S. Typhimurium* portaban los genes de virulencia *spiA*, *sipB*, *tolC*, *lpfC*, *sifA*, *sitC* y *sopB* y en menor frecuencia los genes *pefA* (7%), *spvB* (14,9%) y *cdtB* (1,5%), siendo que ninguno de estos estuvo asociado a enfermedad.

Estos estudios sugieren que las cepas de *S. Typhimurium* aisladas tanto de individuos enfermos y sanos no difieren en factores de virulencia.

Para esta evaluación, existen 10 genes requeridos para la virulencia completa en el modelo murino (Skyberg *et al.*, 2006), los cuales son descritos según su función a continuación:

El gen *spvB*, perteneciente al **plásmido de virulencia de *Salmonella***, cuya función radica en despolimerizar filamentos de actina, destruyendo el citoesqueleto e inhibiendo la formación del autofagosoma en el estado temprano de la autofagia (Chu *et al.*, 2016).

El gen *spiA* codifica la **proteína de la membrana externa del Sistema de Secreción tipo III**, componente de la Isla de Patogenicidad de *Salmonella*- 2, requerido para el transporte de moléculas; de igual manera, como parte del Sistema *Spi/Ssa* secreta proteínas que inhiben la fusión del complejo fagosoma-lisosoma o la acidificación del fagosoma, confiriéndole a *Salmonella* la supervivencia intramacrófago (Uchiya *et al.*, 1999).

El gen *sipB* codifica la **proteína de invasión B**, la cual es necesaria para transferir otras proteínas efectoras dentro de la célula, mediante el Sistema de Secreción Tipo 3 (SST-3) (Kim y Lee, 2017).

El gen *tolC* expresa la **proteína de canal de membrana externa**, requerida para el sistema de excreción de sustancias, como solventes orgánicos y proteínas, y α hemolisinas; de igual manera, funciona como bomba de efusión de moléculas, incluyendo antibióticos (Buckley *et al.*, 2006; Horiyama *et al.*, 2010).

El gen *cdtB* expresa la **subunidad β de la toxina citoletal distensiva**, de *Salmonella* Typhi, la cual causa daños en el ADN, como el arresto celular antes de que se lleve a cabo la mitosis (Ceelen *et al.*, 2006). Estudios recientes refieren que la toxina citoletal es capaz de acentuar los síntomas de la fiebre tifoidea, modular al sistema inmune y favorecer la persistencia *in vivo* de *S. Typhi* (Miller y Wiedmann, 2016); sin embargo, ha sido reportada la presencia inusual de este gen en Serotipos de *Salmonella* No Tifoidea (NTS), como *S. Javiana*, *S. Montevideo*, *S. Orianienburg*, *S. Mississippi* y *S. Typhimurium*, mediante Secuenciamiento Completo del Genoma (WGS) (Figueiredo *et al.*, 2015).

El gen *sitC* expresa el **sistema de transporte de hierro** que interviene en el movimiento transmembrana de dicha sustancia (Sabbagh *et al.*, 2010).

El gen *lpfC* es una de las secuencias fimbriales únicas de *Salmonella* Typhimurium, que codifica la **fimbria polar larga**, que interviene en la colonización intestinal en ratones (Sabbagh *et al.*, 2010).

El gen *sifA* codifica a la **proteína de secreción efectora sifA**, que requiere el sistema de secreción de tipo III, para causar efecto en las células huésped e invadir y alargar la vacuola (SVC), de la que se originan estructuras tubulares, conocidas como filamentos inducidos por *Salmonella* (Sifs) (Brummel *et al.*, 2002).

El gen *sopB* (*Salmonella outer protein*) expresa la **proteína secretora efectora**, la cual mantiene las concentraciones de fosfatidil inositol trifosfato para la elaboración y mantenimiento de la vacuola que contiene a *Salmonella* (SVC), un fagosoma en el cual *Salmonella* sp. replica y evade la exocitosis como parte de la respuesta del hospedero (Steele-Mortimer, 2008; Perret y Zhou, 2013).

El gen *pefA*, al igual que *lpfC*, es una de las secuencias fimbriales únicas de *S. Typhimurium*, el cual expresa la **fimbria codificada en plásmido**, la cual interviene en la adhesión al epitelio intestinal en ratones, con posterior acumulación de fluidos (Ledeboer *et al.*, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución y periodo de duración

La reactivación de cepas, procesamiento y análisis de las muestras se realizó en la Unidad de Biología y Genética Molecular del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos entre los meses de diciembre del año 2017 y mayo del año 2018.

3.2 Descripción del material experimental

El material experimental constó de 100 aislados de *Salmonella* Typhimurium confirmados como tal por la presencia de los genes *invA* (presente solo en *S. enterica* subsp *enterica*) y *flicC* (presente solo en el serovar Typhimurium), identificados en estudios previos. Las muestras se mantuvieron conservadas en caldo cerebro - corazón (BHI) con glicerol al 25% en tubos de 2 ml a una temperatura de -80 °C. Estos aislados comprendieron 10 cepas de cuyes aparentemente sanos (hisopados vaginales o rectales) y 90 cepas de cuyes muertos con lesiones macroscópicas compatibles con salmonelosis (aislados principalmente de hígado, vesícula biliar y contenido intestinal). Como control

positivo para la reacción en cadena de polimerasa (PCR) se utilizó la cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

3.3 Reactivación de cepas

Se reactivaron las cepas de cuyes siguiendo el protocolo establecido por Sánchez y Corrales (2005) con algunas modificaciones según el caso:

- a) Se retiró las cepas criopreservadas de congelación y atemperaron (incubar a 37°C).
- b) Posteriormente, se realizó la siembra en agar XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato) e incubó a 42°C por 24 horas, a fin de observar el crecimiento característico de las colonias.
- c) Transcurrido este tiempo, cuando se visualizaron las colonias se procedió a colocar una colonia aislada en suspensión en 2 ml de caldo LB, y se incubó a 37°C por 3 horas.

3.4 Extracción de ADN

Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de extracción propuesto por Karimnasab *et al.* (2013) de ADN para bacterias Gram negativas, siguiendo algunas modificaciones:

1. Se realizó lavados para eliminar los residuos de caldo de cultivo de las muestras:
 - a) Se centrifugó los microtubos a 12000 rpm por 5 minutos.
 - b) Se descartó el sobrenadante y el exceso de caldo retenido en las tapas.
 - c) Se agregó 50 µl de agua ultrapura estéril y homogenizó a fin de resuspender el pellet.
2. Se colocaron los tubos conteniendo la solución en agua en ebullición (100°C) por 5 minutos.

3. Se homogenizaron las muestras.
4. Los tubos pasaron a centrifugación a 12000 rpm por 5 minutos.
5. Se recuperó el sobrenadante y se colectó en viales de 600 µl. El ADN extraído se preservó en congelación (-80°C).

3.5 PCR Múltiple

La amplificación de los genes que sintetizarán los factores de virulencia e llevó a cabo mediante PCR múltiple. Los *primers* seleccionados para la detección de factores de virulencia de *Salmonella* Typhimurium amplificaron un fragmento de los genes *spvB*, *spiA*, *sipB*, *tolC*, *cdtB*, *sitC*, *lpfC*, *sifA*, *sopB* y *pefA* (cuadro 2), de acuerdo al protocolo descrito por Skyberg *et al.* (2006) modificado en este caso.

Se realizaron dos PCRs múltiples, la primera reacción amplificó los genes *spvB*, *spiA*, *sipB*, *tolC* y *cdtB* y la segunda, a los genes *sitC*, *lpfC*, *sifA*, *sopB* y *pefA*. La mezcla para la realización de las PCR Múltiples consistió de 2µl de Buffer 10X PCR (100 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 20 mM de MgCl₂), 0.5 µl de desoxinucleótido trifosfato (0.25 mM), 1 µl de Mix de *Primers* (0.5 mM), 1.2 µl de MgCl₂ (1.5 mM), 0.25 µl de *Taq* Polimerasa (1 U) y 2.5 µl de ADN, 12.55 µl de agua ultrapura libre de ANRasas y DNAasas, en un volumen total de 20 µl para cada muestra; así mismo, se procesó un control positivo bajo las mismas condiciones que los aislados, el cual fue la cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, a fin de validar la técnica usada.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler Thermalcycler (Bio-Rad). Las temperaturas de amplificación consistieron en una etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos; seguidos por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 66.5°C por 30 segundos, y elongación a 72°C por 1 minuto; y una elongación final a 72°C por 10 minutos.

Los productos obtenidos por PCR múltiple fueron separados mediante electroforesis, en un gel de agarosa al 2% en la cámara de electroforesis horizontal, con buffer TBE 0.5X a 100 mV por 2 horas. Para visualizar las bandas de ADN, se utilizó Bromuro de Etidio como revelador, en un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño de las bandas fue determinado mediante marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Gel Loading Dye, Fermentas).

Cuadro 2. *Primers* empleados en la PCR Múltiple para determinar los factores de virulencia de *Salmonella Typhimurium*. Skyberg *et al.*, 2006.

GEN	SECUENCIA 5' – 3'	Tamaño (pb)
<i>tolC</i>	TACCCAGGCGCAAAAAGAGGCTATC	161
	CCGCGTTATCCAGGTTGTTGC	
<i>cdtB</i>	ACAACTGTCGCATCTCGCCCCGTCATT	268
	CAATTTGCGTGGGTTCTGTAGGTGCGAGT	
<i>sitC</i>	CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC	768
	CGGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	
<i>spiA</i>	CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG	550
	CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	
<i>sopB</i>	CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG	220
	TAGTGATGCCCGTTATGCGTGAGTGTATT	
<i>lpfC</i>	GCCCCGCTGAAGCCTGTGTTGC	641
	AGGTCGCCGCTGTTTGAGGTTGGATA	
<i>sifA</i>	TTTGCCGAACGCGCCCCACACG	449
	GTTGCCTTTTCTTGCGCTTTCCACCCATCT	
<i>spvB</i>	CTATCAGCCCCGCACGGAGAGCAGTTTTTA	717
	GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGCATCATA	
<i>pefA</i>	GCGCCGCTCAGCCGAACCAG	157
	GCAGCAGAAGCCCAGGAAACAGTG	
<i>sipB</i>	GGACGCCGCCCGGGAAAACTCTC	875
	ACACTCCCGTCGCCGCCTTCACAA	

3.6 Análisis de datos

El presente estudio, por ser de tipo descriptivo, presentó resultados expresados en porcentajes organizados en tablas de doble entrada. De manera exploratoria, se usó el Test exacto de Fisher para determinación de diferencias estadísticas entre los porcentajes para la presencia de cada gen entre cepas aisladas de individuos aparentemente sanos / enfermos.

IV. RESULTADOS

Se analizaron un total de 100 aislados confirmados como *Salmonella* Typhimurium en estudios previos, compuestos por 10 muestras de cuyes aparentemente sanos y 90 muestras de cuyes enfermos. Se comprobó su viabilidad mediante resiembra en placas de agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD). Todos los aislados crecieron en el medio mostrando las características típicas de las colonias de *S. Typhimurium* (Figura 5).

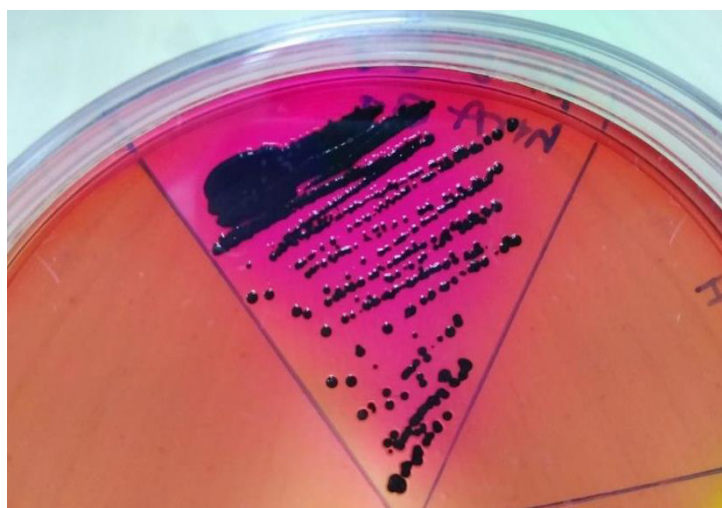


Figura 5. Crecimiento característico de *Salmonella* en medio selectivo XLD.

La presencia de factores de virulencia en todos los aislados de *Salmonella* Typhimurium provenientes de cuyes aparentemente sanos y enfermos se determinó mediante la técnica de PCR Múltiple. Para ello, se llevaron a cabo dos reacciones para detectar 10 genes de virulencia por cada una de los aislados de *S. Typhimurium*. La primera reacción constó de un mix de primers que amplifican un fragmento de los siguientes genes: *tolC* (161 pb), *cdtB* (268 pb), *sipa* (550 pb), *spvB* (717 pb) y *sipB* (875 pb) (Figura 6); y para la segunda reacción se utilizaron 5 pares de oligonucleótidos diferentes que amplifican los fragmentos de los siguientes genes: *pefA* (157 pb), *sopB* (220 pb), *sifA* (449 pb), *lpfC* (641 pb) y *sitC* (768 pb) (Figura 7).

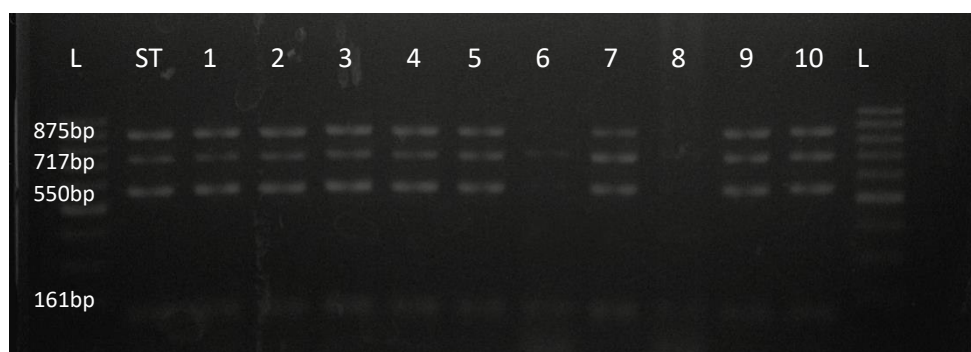


Figura 6. Detección de factores de virulencia de *Salmonella* Typhimurium aislados de cuyes sanos y enfermos mediante PCR múltiple: Los productos amplificados obtenidos son *SipB* (875 pb), *SpvB* (717 pb), *SipA* (550 pb) y *tolC* (161pb). L= Marcador de peso molecular 100 pb. ST= ATCC 14028. 1 – 10= orden de cepas analizadas. El gen *cdtB* (268 bp) no fue amplificado en ningún caso

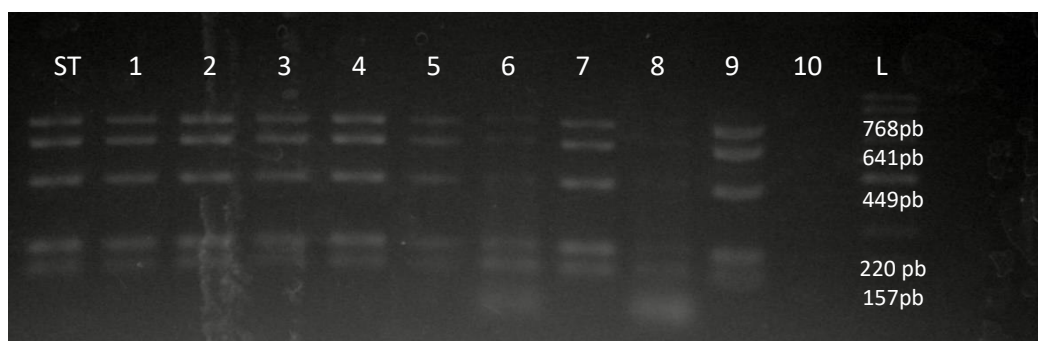


Figura 7. Detección de factores de virulencia de *Salmonella* Typhimurium aislados de cuyes sanos y enfermos mediante PCR múltiple: productos amplificados son *SitC* (768 pb), *lpfC* (641 pb), *SifA* (449 pb), *SopB* (220 pb) y *pefA* (157 pb). ST= ATCC 14028. 1 – 10= orden de cepas analizadas. L= Marcador de peso molecular 100 pb.

Los genes de virulencia evaluados en aislados de *S. Typhimurium* de cobayos aparentemente sanos y enfermos presentaron altos porcentajes de detección, los cuales se encuentran entre el 66% al 100% y el 65.6% al 88.9%, respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Presencia de genes de virulencia de *S. Typhimurium* en aislados de cobayos.

Gen de virulencia	Frecuencia (%)		
	Aparentemente Sanos (n=10)	Enfermos (n=90)	Fisher Test*
<i>tolC</i>	100%	88.9 %	0.59
<i>cdtB</i>	0%	0%	N.A.
<i>sipA</i>	80%	83.3%	0.68
<i>spvB</i>	80%	83.3%	0.68
<i>sipB</i>	60%	78.9%	0.23
<i>pefA</i>	100%	73.3%	0.11
<i>sopB</i>	90%	73.3%	0.44
<i>sifA</i>	70%	65.6%	1.0
<i>lpfC</i>	80%	73.3%	1.0
<i>sitC</i>	60%	73.3%	0.46

*Nivel de confianza: 95%

N.A.= No Aplicable

Dos de los genes evaluados, *tolC* y *pefA* estuvieron presentes en todos los aislados de cobayos sanos (100%), mientras que los aislados de cobayos enfermos los presentaron en menor frecuencia (88.9% y 73.3%, respectivamente).

Los genes *sipB* y *sitC* fueron hallados en menor frecuencia en aislados de cuyes aparentemente sanos que en aislados en cuyes enfermos (60% vs 78.9% y 60% vs 73.3%, respectivamente), mientras que los 8 genes restantes fueron hallados en mayor frecuencia en los aislados de cuyes aparentemente sanos que en los enfermos, fluctuando entre 70% a 100%; con excepción del gen *cdtB*, el cual no fue identificado en ninguna reacción.

De los aislados de *S. Typhimurium*, se observó que el 30% (3/10) perteneciente a cuyes aparentemente sanos presentaron 9 de los 10 genes de virulencia evaluados, mientras que el 70% (7/10) de aislados restantes presentó como mínimo 5 genes de virulencia, de forma variada. De igual modo, el 48.88% (44/90) de aislados procedente de cuyes enfermos presentaron 9 de los 10 genes de virulencia evaluados, mientras que el 2.22% (2/90) presentó un solo gen de virulencia (*tolC*) y el 5.55% (5/90) no amplificó ningún gen.

Para ningún gen de virulencia evaluado se halló diferencia estadística en los porcentajes entre aislados de *S. Typhimurium* procedentes de individuos aparentemente sanos y enfermos.

V. DISCUSIÓN

Diversos estudios acerca de la sanidad del cuy demuestran su alta susceptibilidad a la salmonelosis (Chauca, 1997), enfermedad que causa alta morbilidad y mortalidad (Layme *et al.*, 2011) la cual es considerada por los productores como una de las más frecuentes en las explotaciones y, junto con la neumonía, son denominadas comúnmente como “peste” (Aguilar *et al.*, 2011). La presentación de la enfermedad se ve influenciada por el estrés originado a causa del tipo de manejo y bajo nivel de bioseguridad, que favorecen a la contaminación del alimento y ambiente (Matsuura *et al.*, 2010).

A lo largo de su evolución, *Salmonella* spp. ha venido adaptándose a las variaciones del medio a fin de sobrevivir en su hospedero, modulando la expresión coordinada de genes, los cuales codifican factores de virulencia que interactúan directamente con la célula blanco, desempeñan importantes papeles en patogénesis y mantenimiento de la enfermedad en el hospedero, valga decir que contribuyen activamente con la virulencia de *Salmonella* (López *et al.*, 2012; Saldarriaga y Rugeles, 2001; Skyberg *et al.*, 2006). Existen muchos factores de virulencia en el género *Salmonella*, los cuales son responsables de la invasión, supervivencia y diseminación intrainestinal, estando la

mayoría de estos dispuestos en organizaciones génicas llamados Islas de patogenicidad (SPI), que suelen ser adquiridas mediante transferencia horizontal, pudiendo variar el número de SPIs entre especies, subespecies y serotipos de *Salmonella* (van Asten y van Dijk, 2004). Esta variabilidad de presencia/ausencia de diversos genes responsables de la virulencia en *Salmonella*, podría sugerir diferencias entre cepas causantes de diversas sintomatologías en los animales afectados.

En el cuy, el principal serovar causante de la enfermedad es *Salmonella* Typhimurium (Layme *et al.*, 2011; Marcelo *et al.*, 2017) el cual puede presentarse como casos de animales infectados sin sintomatología aparente en contraste con aquellos causantes de infecciones entéricas con mortalidad, abortos y problemas nerviosos (Chero *et al.*, 2017; Patterson *et al.*, 2016).

Con el fin de esclarecer la epidemiología de la transmisión de *Salmonella* Typhimurium y así poder controlar y prevenir esta infección en los animales, se hace necesario conocer si existe diferencia en determinados factores de virulencia de *Salmonella*, en aislados de cobayos enfermos y aparentemente sanos, y si esta guarda relación con el estado de enfermedad o salud en dichos animales, debido al gran impacto que implica un brote de salmonelosis así como la presencia de portadores, dentro de la producción de cuyes.

La técnica utilizada para evaluar la presencia o ausencia de dichos factores fue PCR Múltiple para 10 genes de virulencia de *Salmonella* Typhimurium (Cuadro 2), los cuales demuestra la frecuencia de presentación de dichos genes en cada aislado.

Los genes *sipB*, *sitC* y *sopB*, ubicados en SPI-1 (Kim y Lee, 2017; Perret y Zhou, 2013), los genes *spiA* y *sifA* ubicados en SPI-2 (Kim y Lee, 2017; Figueroa y Verdugo, 2005) y el gen *lpfC*, el cual es un operon fimbrial (Sabbagh *et al.*, 2010), fueron hallados en un porcentaje variable (Cuadro 3) de 65.6% - 83.3%, siendo los genes más frecuentes *spiA*

y *sipB*, con 83.3% y 78.9%, respectivamente, dentro de los aislados de animales enfermos; mientras que en el caso de los animales aparentemente sanos se obtuvieron frecuencias desde el 60% - 90%, siendo el gen predominante *sopB*, el cual se presenta en el 90% de los aislados de cuyes aparentemente sanos.

Los resultados mencionados, presentan similitud a lo obtenido por Tamang *et al.* (2014), quienes evaluaron los genes de virulencia de *Salmonella* Typhimurium procedentes de cerdos, sin embargo, dicha evaluación evidenció frecuencias de presentación mucho más altas a las obtenidas en este estudio. Los cerdos enfermos presentaron los genes *sipB*, *sitC*, *sopB*, *lpfC* y *sifA* en altos porcentajes (todos el 99.1%), mientras que el gen *spiA* se presentó en el 100% de aislado de cerdos enfermos. En los aislados de cerdos sanos se presentaron, de igual manera, en muy altos porcentajes, desde 94.9% hasta 97.9%, siendo los genes de virulencia más frecuentes *spiA* y *sifA* (con 97.9% de presentación ambos).

Otro estudio, llevado a cabo por Krawiec *et al.* (2015) obtuvo que los genes *spiA*, *lpfC*, *sifA* se encontraron en el 100% de aislados de *S. Typhimurium* procedentes de aves silvestres enfermas y sanas; mientras que los genes *sitC* y *sopB* se presentaron en el 94.45% de las mismas, determinándose alta homogeneidad dentro del serovar Typhimurium pese a que los genes que presentan son altamente variables.

Los ensayos mencionados concuerdan con Skyberg *et al.* (2006) quien obtiene que para éstos genes evaluados en aislados de aves, no existe diferencia entre cepas procedentes de aves enfermas y aves sanas, lo cual podría estar asociado con la ubicación de dichos genes en diversas las Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (SPI), donde la adquisición de una SPI puede convertir un microorganismo comensal en patógeno; sin embargo, esto no garantiza la transformación, sino que la virulencia dependerá del microorganismo receptor y del hospedador (Marcus *et al.*, 2000; Martínez, 2007). Ejemplo de ello, es la alta presencia del gen *sopB* en aislados de cuyes aparentemente sanos, el cual es un efector

que cumple más de un rol a nivel de invasión, replicación y maduración dentro de la Vacuola Contenedora de *Salmonella* (SCV) (Perret y Zhou, 2013); sin embargo, su alta frecuencia de presentación no fue determinante para causar enfermedad de manera individual en los cuyes aparentemente sanos, de los cuales se aisló *Salmonella* Typhimurum previamente.

Con respecto a los genes *pefA* y *spvB*, codificados en plásmidos de virulencia (Pilla y Tang, 2018), fueron hallados en un porcentaje de 73.3% y 83.3% (Cuadro 3), respectivamente en los aislados de animales enfermos, mientras que en los aislados de cuyes aparentemente sanos *pefA* se presentó en el 100% de los casos y *spvB* en el 80% (Cuadro 3).

Los resultados obtenidos en este estudio difieren con Tamang *et al.* (2014), quien halló diferentes porcentajes para los genes *pefA* y *spvB*, con 5.5% y 9.2% respectivamente, para cerdos enfermos versus 8.4% y 20.3%, respectivamente, para cerdos sanos; mientras que dicho estudio citado coincide con Krawiec *et al.* (2015) al obtener valores de detección bajos para ambos genes tanto en aves silvestres sanas como enfermas.

Esta diferencia de resultados obtenidos en el presente estudio para dichos genes evaluados puede estar relacionada a la ubicación de éstos en plásmidos de virulencia (Martínez, 2007), los cuales se propagan por transferencia horizontal mediante transformación o conjugación (Pilla y Tang, 2018); pues se conoce que no todos los miembros de un serovar contienen el plásmido de virulencia; más bien, a menudo dentro de la población su presencia suele ser variable, donde los serovares con amplio rango de hospederos, como es el caso de *Salmonella* Typhimurium, muestran mayor variabilidad genética que los serovares adaptados o restringidos (Silva *et al.*, 2017).

En el caso del gen *tolC*, de origen cromosomal, este se presentó en mayor frecuencia en todos los aislados, apareciendo en el 88.9% de aislados de cuyes enfermos y en el 100% de aislados de cuyes aparentemente sanos (Cuadro 3); semejante a lo obtenido por Tamang *et al.* (2014) en su evaluación, donde obtuvo 99.5% de prevalencia para cerdos enfermos y 97.5% para cerdos sanos de dicho gen de *S. Typhimurium* y a lo obtenido por Skyberget *et al.* (2006), donde el gen se encuentra en el 100% de aislados tanto de aves enfermas como sanas.

Este gen presenta importancia en la supervivencia de *Salmonella Typhimurium*, puesto que *tolC* es el mayor canal de la membrana exterior de la bacteria, otorgándole un papel importante durante la colonización e infección del hospedero, así como la secreción y exportación de moléculas y toxinas; así mismo, este gen le confiere a *Salmonella Typhimurium* la capacidad innata de multidrogo resistencia (MDR) frente a antibióticos de uso clínico relevante (Horiyama *et al.*, 2010; Ricci y Piddock, 2010).

Debido a la importancia en los procesos biológicos de la bacteria mencionados anteriormente, es esperado que se encuentre en alta frecuencia el gen *tolC*, lo que puede estar relacionado con el hecho de tratarse de un gen altamente conservado en todos los serovares de *Salmonella* (Ricci y Piddock, 2010), donde el *knockout* del mismo anula su capacidad de adherirse, invadir y sobrevivir dentro de la célula, deteriorando la supervivencia celular a pesar que la bacteria aún puede replicarse (Buckley *et al.*, 2006).

El gen *cdtB* es quizá el que más llama la atención en este estudio, debido a su ausencia de presentación. Dicho gen, que se encuentra codificado en la Isla de Patogenicidad 11 (SPI-11) en *Salmonella Typhi* (Sabbagh *et al.*, 2010), media la expresión de la toxina tifoidea durante la localización de la bacteria en la Vacuola Contenedora de *Salmonella* (SCV) (Johnson *et al.*, 2018); sin embargo, mediante la técnica de microArray y Secuenciamiento del Genoma Completo (WGS) se detectó su presencia inusual en

Salmonella Typhimurium Sal199 aislada de carne cruda de aves de corral (Silva *et al.*, 2017), por lo que se presume el traspaso de genes mediante transferencia horizontal de *S. Typhi* a *S. Typhimurium* (Figuereido *et al.*, 2015), lo cual es compatible con los resultados obtenidos por Tamang (2014) para el gen *cdtB*, donde solo el 3% de los aislados de *S. Typhimurium* procedentes de cerdos sanos presentaron el gen, no hallándose en aislados de cerdos enfermos; sin embargo, difiere con Skyberg *et al.* (2006) y Krawiec *et al.* (2015), quienes en ningún caso detectaron dicho gen dentro de los animales evaluados positivos a *S. Typhimurium* en sus respectivos estudios, siendo el mismo caso este estudio, donde no hubo amplificación del gen *cdtB* tanto para aislados de cuyes enfermos como cuyes sanos; sin embargo, dado que la cepa control ATCC 14028 carece del gen *cdtB*, no puede ser discutido en ésta evaluación.

Es posible que la variabilidad en la presentación de los genes de virulencia analizados en éste estudio pueda relacionarse con el tipo de técnica de extracción de ADN por ebullición, con la cual se obtiene ADN geonómico unido al material celular y a proteínas desnaturalizadas (Hernández *et al.*, 2009); sin embargo, la eficiencia de la PCR asociada al método de extracción de ADN por ebullición, arroja resultados similares a los obtenidos mediante un kit de extracción; no obstante, las muestras de ADN degradan con mayor facilidad y no pueden ser almacenadas por largos periodos de tiempo a 4°C; aun así, la rapidez y el bajo costo de la técnica de hervido y centrifugado debe ser enfatizada, en comparación con métodos costosos y laboriosos (Freschi *et al.* 2005). Esto pudo ser replicado en el presente y otros estudios, como es el caso de Tamang *et al.* (2014) quien obtuvo buenos resultados de detección de genes de virulencia de *S. Typhimurium*, haciendo uso de dicho método de extracción. De igual manera, Espinosa *et al.* (2013), aplicó el método de hervido con algunas modificaciones para tipificar cepas de *Streptococcus suis*, demostrando que el método es válido para poder amplificar ADN, con lo cual se demuestra su utilidad cuando se requiere procesar un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo.

De manera exploratoria, se sometieron los resultados al Test exacto de Fischer, el cual no evidenció diferencias estadísticas en los porcentajes de detección de cada gen de virulencia entre los cuyes aparentemente sanos y enfermos, es decir, no hubo una relación aparente entre la presentación individual de los genes de *S. Typhimurium* con el estado sanitario del animal. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Skyberg *et al.* (2006), Mezal *et al.* (2014), Tamang *et al.* (2014) y Mather *et al.* (2016), los cuales, en aislados de *S. Typhimurium* de diversas especies animales, concluyeron que no había relación entre genes de virulencia y estados de salud y enfermedad.

Sin embargo, es alarmante la presencia de *Salmonella Typhimurium* en cuyes aparentemente sanos, y que, además de ello, los aislados presenten muchos de los genes de virulencia requeridos para el desarrollo de la patogénesis (Skyberg *et al.*, 2006), pues éstos representan un peligro para la producción debido a su carácter de portadores asintomáticos, diseminadores de la enfermedad (Schultz *et al.*, 2018). Pese a ello, el que no se desarrolle la enfermedad en éstos individuos aparentemente sanos podría estar relacionado a otros factores, entre ellos, los alimentarios, donde las variaciones en el tipo de alimento pueden modificar la flora intestinal y de esta forma favorecer el desarrollo de bacterias gramnegativas, como es el caso de *Salmonella* (Mejía, 2003).

Otros factores radican en el sistema de manejo y el nivel de bioseguridad que se aplica, donde malas prácticas de limpieza y desinfección periódica traen consigo la contaminación de los animales (Mejía, 2003); además de ello, el ingreso de otros animales a la granja conlleva a la transmisión de la enfermedad, como fue demostrado por Barber *et al.* (2002), quien correlacionó la presencia de diversos vectores (como moscas, aves, gatos, botas, entre otros) con la diseminación de *Salmonella* dentro de las granas de cerdos evaluadas.

Debido a las dificultades que se presentaron en el desarrollo de éste estudio, como la disparidad entre la cantidad de aislados de *Salmonella* Typhimurium de cuyes aparentemente sanos y enfermos analizados, la cantidad de genes evaluados así como la técnica escogida, pues se conoce que mediante técnicas de Secuenciamiento del genoma bacteriano es posible determinar mucha mayor cantidad de proteínas asociadas a la virulencia (Aleman, 2019), se hace necesaria la realización de estudios próximos que evalúen tanto la presencia de los genes, así como la expresión de los mismos y se defina su importancia dentro de la patogenia específica de Salmonelosis en cuyes, debido al potencial peligro que representan los animales con enfermedad subclínica y más aún, los portadores dentro de la producción.

VI. CONCLUSIONES

- Los aislados de *Salmonella* Typhimurium presentaron un patrón genético similar, con frecuencias variables, mayores al 60% en los genes de virulencia, tanto en cuyes enfermos como aparentemente sanos.
- No existe diferencia entre los factores de virulencia presentes en aislados de *Salmonella* Typhimurium provenientes de cuyes enfermos y cuyes aparentemente sanos.

VII. RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar próximos estudios *in vivo*, con un muestreo aleatorizado y con mayor número de individuos para el caso de los cuyes aparentemente sanos, donde se lleven a cabo ensayos de expresión génica de los factores de virulencia evaluados en este trabajo, con la finalidad de conocer si la presencia de un determinado gen garantiza la síntesis de ARNm para su posterior traducción en una proteína que participe activamente del desarrollo de la patogénesis de la enfermedad o cumpla una función reguladora.

VIII. LITERATURA CITADA

1. **Aguilar G, Bustamante J, Bazán V, Falcón N. 2011.** Diagnóstico situacional de la crianza de cuyes en una zona de Cajamarca. *Rev Inv Vet Per.* 22(1), 09-14.
2. **Aleman M. 2019.** Caracterización genómica de la capacidad virulenta de una cepa de *Salmonella* Typhimurium aislada de *Cavia porcellus* (cuy). Tesis de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 104 p.
3. **Barber D, Bahnson P, Isaacson R, Jones C, Weigel R. 2002.** Distribution of *Salmonella* in swine production ecosystems. *J Food Prot.* 65(12): 1861–1868.
4. **Barreto M, Castillo-Ruiz M, Retamal P. 2016.** *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Rev Chil Infectol.* 33(5), 547-557.
5. **Bartholomew M, Heffernan R, Wright J, Klos R, Monson T, Khan S, Trees E, Sabol A, Willems R, Flynn R, Deasy M, Jones B, Davis J. 2014.** Multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infection associated with pet guinea pigs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14(6): 414-421.
6. **Branchu P, Bawn M, Kingsley R. 2018.** Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Pathovariants. *Infect Immun.* 23: 86(8).
7. **Brenner F, Villar R, Angulo F, Tauxe R, Swaminathan B. 2000.** *Salmonella* nomenclature. *Clin Microbiol*; 38(7):2465-2467.
8. **Brumell J, Goosney D, Finlay B. 2002.** *SifA*, a type III secreted effector of *Salmonella* Typhimurium, directs *Salmonella* induced filament (*Sif*) formation along microtubules. *Traffic* 3, 407–415.

9. **Buckley A, Webber M, Cooles S, Randall L, La Ragione R, Woodward M, Piddock L. 2006.** The *AcrAB-TolC* efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol.* 8(5): 847-856.
10. **Casart Y, Falconí M. 2016.** Tipificación molecular de *Salmonella* aislada de cuyes (*Cavia porcellus*) de Loja, Ecuador. *Rev Científ Ecuatoriana* 3: 38-42.
11. **Ceelen L, Decostere A, Ducatelle R, Haesebrouck F. 2006.** Cytolethal distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. *Microbiol Res* 161 (2): 109 –120.
12. **Chauca L. 1997.** Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Estudio FAO. Producción y sanidad animal. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y alimentación. Roma – Italia. [Internet], [02 noviembre 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/W6562s/W6562s00.htm>
13. **Chero A, Rosadio R, Marcelo G, Díaz G, Jiménez R, Castro Y, Maturrano L. 2017.** Identificación Molecular de *Salmonella Typhimurium* en Cuyes al Primer Parto mediante la Técnica de PCR Múltiple. *Rev Inv Vet Per.* 28(3): 679-686.
14. **[CFSPH] Center for Food Security and Public Health. 2005.** Animal disease factsheets. Salmonellosis. Ames, IA, USA: Iowa State University. 8 p. [Internet] [01 diciembre 2018]. Disponible en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/nontyphoidal_salmonellosis.pdf
15. **Chirinos O, Muro Mesones K, Concha W, Otiniano J, Quezada J, Rios V. 2008.** Crianza y comercialización de cuy para el mercado limeño. – Lima. Universidad ESAN. Serie Gerencia Global 8.
16. **Chiu C, Ou J. 1996.** Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol.* 34(10): 2619-2622.

17. **Chu Y, Gao S, Wang T, Yan J, Xu G, Li Y, Niu H, Huang R, Wu S. 2016.** A novel contribution of *spvB* to pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium by inhibiting autophagy in host cells. *Oncotarget*. 7(7):8295-309.
18. **Díaz G, Rosadio R, Marcelo G, Chero A, Jiménez R, Reyna I, Maturrano L. 2017.** Evaluación de una Técnica de PCR-Múltiple para la detección rápida de *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis en cuyes (*Cavia porcellus*) naturalmente infectados. *Rev Inv Vet Per*. 28(3): 713-722.
19. **[DRAC] Dirección Regional de Agricultura Cusco. 2016.** Rubro Estadística Pecuaria. Cusco: DRAC. Boletín Pecuario regional. 8 p.
20. **Eng S, Pusparajah P, Ab Mutalib N, Ser H, Chan K, Lee L. 2015.** *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers Life Sci*. 8(3): 284 – 293.
21. **Espinosa I, Báez M, Percedo M, Martínez S. 2013.** Evaluation of simplified DNA extraction methods for *Streptococcus suis* typing. *Rev. Salud Anim*. 35(1): 59 – 63.
22. **Figueiredo R, Card R, Nunes C, AbuOun M, Bagnall M, Nunez J, Mendonça N, Anjum M, da Silva G. 2015.** Virulence characterization of *Salmonella enterica* by a New Microarray: detection and evaluation of the Cytolethal Distending Toxin Gene Activity in the unusual host *S. Typhimurium*. *PLoS One*. 10(8): e0135010.
23. **Figueroa I, Verdugo A. 2005.** Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev Latinoam Microbiol*. 47(1–2): 25–42.
24. **Flores L. 2003.** Caracterización fenotípica y genotípica de estirpes de *Salmonella choleraesuis* aisladas de ambientes marinos. Tesis para optar el grado de Licenciado en Biología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 142 p.
25. **Freschi C, de Oliveira F, de Oliveira B. 2005.** Comparison of DNA-extraction methods and selective enrichment broths on the detection of *Salmonella*

- Typhimurium in swine feces by Polymerase Chain Reaction (PCR). Brazilian Journal of Microbiology 36: 363 – 367.
26. **Gil-Santos V. 2007.** Importancia del cuy y su competitividad en el mercado. Arch. Latinoam Prod Anim; 15(1): 216-217.
27. **Gonzalez-Escobedo G, Gunn J. 2013.** Gallbladder epithelium as a niche for chronic Salmonella carriage. Infect Immun. 81(8): 2920-2930.
28. **González-Pedraza J, Pereira N, Soto Z, Hernández E, Villarreal J. 2014.** Aislamiento microbiológico de *Salmonella spp.* y herramientas moleculares para su detección. Salud Uninorte; 30(1): 73-94.
29. **Grimont P, Weill F. 2007.** Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars. 9th. Paris, France: WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur. [Internet] [01 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.scacm.org/free/Antigenic%20Formulae%20of%20the%20Salmonella%20Serovars%202007%209th%20edition.pdf>.
30. **Helaine S, Thompson J, Watson K, Liu M, Boyle C, Holden D. 2010.** Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. Proc Natl Acad Sci USA. 107(8): 3746-3751.
31. **Hendriksen S, Orsel K, Wagenaar J, Miko A, van Duijkeren E. 2004.** Animal-to-human transmission of *Salmonella* Typhimurium DT104A variant. Emerg Infect Dis; 10(12): 2225-2227.
32. **Hernández Y, Lobo E, Martínez S, Zamora L. 2009.** Evaluación de diferentes métodos de extracción de ADN de Micoplasmas para su empleo en el diagnóstico por PCR. Rev. Salud Anim. 31(2):108 – 114.

33. **Horiyama T, Yamaguchi A, Nishino K. 2010.** *TolC* dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Antimicrob Chemother. 65(7):1372-1376.
34. **Ibarra JA, Steele-Mortimer O. 2009.** *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. Cell Microbiol. 11(11): 1579-1586.
35. **Iijima O, Saito M, Nakayama K, Kobayashi S, Matsuno K, Nakagawa M. 1987.** Epizootiological studies of *Salmonella* typhimurium infection in guinea pigs. Jikken Dobutsu. 36(1): 39-49.
36. **Jamshidi A, Kalidari G, Hedayati M. 2010.** Isolation and identification of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from the eggs of retail stores in Mashhad, Iran using conventional culture method and multiplex PCR assay. J Food Safety. 30: 558-568.
37. **Johnson R, Mylona E, Frankel G. 2018.** Typhoidal *Salmonella*: Distinctive virulence factors and pathogenesis. Cellular Microbiology 20: e12939. 1–14.
38. **Karimnasab N, Tadayon K, Khaki P, Bidhendi S, Ghaderi R, Sekhavati M, Asadi F. 2013.** An optimized affordable DNA-extraction method from *Salmonella enterica* Enteritidis for PCR experiments. Archiv Razi Inst. 68(2): 105-109.
39. **Kaur J, Jain S. 2012.** Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. Microbiol Res. 167(4): 199-210.
40. **Kim j, Lee Y. 2017.** Molecular characterization of antimicrobial resistant non-typhoidal *Salmonella* from poultry industries in Korea. Irish Veterinary Journal 70: 1-9.

41. **Krawiec M, Kuczkowski M, Kruszewicz A, Wieliczko A. 2015.** Prevalence and genetic characteristics of *Salmonella* in free-living birds in Poland. BMC Vet Res. 11:15.
42. **Kuhle V, Hensel M. 2004.** Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. Cell Mol Life Sci. 61(22): 2812-2826.
43. **[INIA] Instituto Nacional de Investigación Agraria. 1995.** Proyecto Sistemas de Producción de Cuyes. Lima. INIA.
44. **Layme A, Perales R, Chavera A, Gavidia C, Calle S. 2011.** Lesiones anatomopatológicas en cuyes (*Cavia porcellus*) con diagnóstico bacteriológico de *Salmonella* sp. Rev Inv Vet Per. 22(4): 369-376.
45. **Ledeboer N, Frye J, McClelland M, Jones B. 2006.** *Salmonella* entérica serovar Typhimurium Requires the Lpf, Pef, and Tafi Fimbriae for Biofilm Formation on HEp-2 Tissue Culture Cells and Chicken Intestinal Epithelium. Infection and Immunity 74: 3156-3169.
46. **Looney R, Steigbigel R. 1986.** Role of the Vi antigen of *Salmonella typhi* in resistance to host defense *in vitro*. J Lab Clin Med. 108(5): 506-516.
47. **López C, Winter S, Rivera-Chávez F, Xavier M, Poon V, Nuccio S, Tsolis R, Bäumler AJ. 2012.** Phage-mediated acquisition of a type III secreted effector protein boosts growth of salmonella by nitrate respiration. MBio. 12: 3(3).
48. **Luigi T, Rojas L, Valbuena O. 2015.** Reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de *Salmonella* spp. usando el gen *invA*. Salus. 19(3), 41-46.
49. **Maciel B, Passos R, Sriranganathan N. 2017.** *Salmonella enterica*: Latency. En: Mares M. (Ed.) Current Topics in *Salmonella* and Salmonellosis. IntechOpen: Rijeka, Croatia.

50. **Marcelo G, Rosadio R, Chero A, Díaz G, Ciprian A, Maturrano L. 2017.** Identificación de *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium en cuyes mediante la técnica de PCR múltiple. Rev Inv Vet Per. 28(2), 411-417.
51. **Marcus S, Brumell J, Pfeifer C, Finlay B. 2000.** *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes and infection 2: 145-156.
52. **Martínez N. 2007.** Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella* entérica. Tesis para optar el grado doctor. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. Oviedo, España. 154 p
53. **Mather A, Lawson B, de Pinna E, Wigley P, Parkhill J, Thomson N, Page A, Holmes M, Paterson G. 2016.** Genomic Analysis of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium from Wild Passerines in England and Wales. Appl Environ Microbiol. 82(22): 6728-6735.
54. **Matsuura A, Morales S, Calle S, Ara M. 2010.** Susceptibilidad a antibacterianos *in vitro* de *Salmonella enterica* aislada de cuyes de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz, Áncash. Rev Inv Vet Per. 21(1): 93-99.
55. **McQuiston J, Waters R, Dinsmore B, Mikoleit M, Fields P. 2011.** Molecular determination of H antigens of *Salmonella* by use of a microsphere-based liquid array. J Clin Microbiol. 49(2): 565-573.
56. **Mejía W. 2003.** Epidemiología de la Salmonelosis porcina en granjas de Cataluña y determinación de los factores de riesgo de la infección. Tesis de Doctor en Medicina Veterinaria. Barcelona: Univ. Autónoma de Barcelona. 98 p.
57. **Méndez S, Pérez E. 2004.** La PCR Múltiple en Microbiología Clínica. Enf Inf Microbiol Clin. 22(3): 183 – 192.

58. **Menendez A, Arena E, Guttman J, Thorson L, Vallance B, Vogl W, Finlay B. 2009.** *Salmonella* infection of gallbladder epithelial cells drives local inflammation and injury in a model of acute typhoid fever. J Infect Dis. 200(11): 1703-1713.
59. **Mezal E, Sabol A, Khan M, Ali N, Stefanova R, Khan A. 2014.** Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. Food Microbiol. 38:67-74.
60. **Miller R, Wiedmann M. 2016.** The Cytolethal Distending Toxin produced by Nontyphoidal *Salmonella* Serotypes Javiana, Montevideo, Oranienburg, and Mississippi induces DNA damage in a manner similar to that of Serotype Typhi. MBio. 20:7(6).
61. **[MINAGRI] Ministerio de agricultura y riego. 2015.** Situación de las actividades de crianza y producción de Cuyes. [Internet], [01 diciembre 2018]. Disponible en: <http://www.minagri.gob.pe/portal/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-yproducci/300-cuyes?star=1&start=1>
62. **Monack D. 2012.** *Salmonella* persistence and transmission strategies. Curr Opin Microbiol. 15(1): 100-107.
63. **Murugkar H, Rahman H, Dutta P. 2003.** Distribution of virulence genes in *Salmonella* serovars isolated from man & animals. Indian J Med Res; 117: 66-70.
64. **Nakoneczna I, Hsu H. 1980.** The comparative histopathology of primary and secondary lesions in murine salmonellosis. Br J Exp Pathol. 61(1): 76-84.
65. **Nwabor O, Dickson I, Ajibo Q. 2015.** Epidemiology of *Salmonella* and Salmonellosis. Int Letters Nat Sci. 47: 54-73.
66. **Padilla F. 2006.** Crianza de cuyes. Editorial Macro., Lima – Perú.
67. **Paião F, Arisitides L, Murate L, Vilas-Bôas G, Vilas-Boas L, Shimokomaki M. 2013.** Detection of *Salmonella* spp, *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium in

- naturally infected broiler chickens by a multiplex PCR-based assay. *Braz J Microbiol.* 44(1): 37-41.
68. **Palomino C, González Y. 2014.** Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Per Med Exp Salud Pub.* 31(3), 535-546.
 69. **Patterson S, Kim H, Borewicz K, Isaacson R. 2017.** Towards an understanding of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium persistence in swine. *Animal Health Research Reviews* 17(2): 159-168.
 70. **Perrett C, Zhou D. 2013.** *Salmonella* type III effector *SopB* modulates host cell exocytosis. *Emerg Microbes Infect.* 2(5):e32.
 71. **PHE, GOV.UK. 2015.** *Salmonella* infections (faecal specimens) England and Wales, laboratory reports (PHE salmonella data set) July 2015. [Internet] [02 diciembre 2018]. Disponible en: <https://www.gov.uk/government/publications/salmonella-infections-faecal-specimens-in-england-and-wales-laboratory-reports-2015/salmonella-infections-faecal-specimens-england-and-wales-laboratory-reports-phe-salmonella-data-set-july-2015>
 72. **Pilla G, Tang C. 2018.** Going around in circles: virulence plasmids in the enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 16: 484-495.
 73. **Ramírez I. 1972.** Estudio bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos (*Cavia porcellus*). Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 62 p.
 74. **Ricci V, Piddock L. 2010.** Exploiting the role of *TolC* in pathogenicity: identification of a bacteriophage for eradication of *Salmonella* serovars from poultry. *Appl Environ Microbiol.* 76(5): 1704-1706.

75. **Sabbagh S, Forest C, Lepage C, Leclerc J, Daigle F. 2010.** So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett* 305: 1-13.
76. **[SAG] Servicio Agrícola y Ganadero. 2002.** Instructivo técnico para la detección de *Salmonella spp.* Según ISO 6579: 2002 (E). Santiago: SAG. Informe técnico. 19 p.
77. **Saldarriaga, O, Rugeles M. 2001.** Genes y plásmidos de la *Salmonella spp.* asociados con virulencia. *Rev Col Cienc Pec.* 14(1): 11-19.
78. **Sánchez L, Corrales R. 2005.** Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *NOVA* 3(4): 21-29.
79. **Sandoval A, Floresvillar J, Meza A. 2013.** Reacción en cadena de la polimerasa. En: *Biología Molecular, Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud.* México: McGraw-Hill. P 145 – 159.
80. **Schultz B, Salazar G, Paduro C, Pardo-Roa C, Pizarro D, Salazar-Echegarai F, Torres J, Riedel C, Kalergis A, Álvarez-Lobos M, Bueno S. 2018.** Persistent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Infection Increases the Susceptibility of Mice to Develop Intestinal Inflammation. *Frontiers in Immunology* 9: 1-12p.
81. **Silva C, Puente J, Calva E. 2017.** *Salmonella* virulence plasmid: pathogenesis and ecology. *Pathogens and disease* 75 (3): 1 – 5.
82. **Skyberg J, Logue C, Nolan L. 2006.** Virulence genotyping of *Salmonella spp.* with multiplex PCR. *Avian Dis;* 50(1): 77-81.
83. **Steele-Mortimer O. 2008.** The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol.* 11(1): 38-45.
84. **Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker S. 2012.** *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res Int.* 45(2): 502-531.

85. **Sterzenbach T, Crawford RW, Winter S, Baumler A. 2012.** *Salmonella* Virulence Mechanisms and their Genetic Basis. En Barrow PA, Methner U. *Salmonella* in Domestic Animals. 2da Edición. CAB International
86. **Tamang M, Gurung M, Nam H, Moon D, Jang G, Jung S, Lim S. 2014.** Antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of *Salmonella enterica* Typhimurium isolates from healthy and diseased pigs in Korea. J Food Prot. 77(9):1481-1486.
87. **Uchiya K, Barbieri M, Funato K, Shah A, Stahl P, Groisman E. 1999.** A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. EMBO J. 18(14): 3924-3933.
88. **van Asten A, van Dijk J. 2005.** Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. FEMS Immunol Med Microbiol. 44(3): 251-259.
89. **Viljoen G, Nel L, Crowther J. 2005.** Molecular diagnostics PCR Handbook. Springer Netherlands
90. **Wattiau P, Boland C, Bertrand S. 2011.** Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. Appl Environ Microbiol. 77(22):7877-85.
91. **Yoshida C, Kruczkiewicz P, Laing C, Lingohr E, Gannon V, Nash J, Taboada E. 2016.** The *Salmonella In Silico* Typing Resource (SISTR): An Open Web-Accessible Tool for Rapidly Typing and Subtyping Draft *Salmonella* Genome Assemblies. PLoS One. 11(1):e0147101.